Zur Charakterisierung eines mit dem ILT - Virus serologisch verwandten Herpesvirus aus Amazonen

Dagmar Kitzing

München 1981

Aus der Klinik für Innere Krankheiten der Tiere
Lehrstuhl für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels, der Zier- und Zoovögel der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand : Prof. Dr. Irmgard Gylstorff

Zur Charakterisierung eines mit dem ILT - Virus serologisch verwandten Herpesvirus aus Amazonen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Dagmar Kitzing
aus München
München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent:	Prof. Dr. I. Gylstorff
Korreferent:	Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546818_0029

Definition verwendeter Abkürzungen

AAF	Amnioallantoisflüssigkeit
Abb.	Abbildung
AH	Amnioallantoishöhle
bzw.	beziehungsweise
^{o}C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CAM	Chorioallantoismembran
CO_2	Kohlendioxyd
CPE	cytopathischer Effekt
dest.	destillata
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DO	Dottersack
EID_{50}	Eiinfektiöse Dosis $_{50}$
FHE	Hühnerembryofibroblasten
FME	Moschusentenembryofibroblasten
g/l	Gramm/Liter
HE	Hämatoxylin-Eosin
H_2O	Wasser
ILT	Infektiöse Laryngotracheitis
JUDR	Joddesoxyuridin
KID_{50}	Kulturinfektiöse Dosis $_{50}$
log	Logarythmus
M	Molar
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid

Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
PBS	Phosphor Buffered Saline
RNS	Ribonukleinsäure
SPF	spezifisch pathogen frei
TC	Tissue Culture
Tab.	Tabelle
µ	Mikrometer
UV-Licht	ultraviolettes Licht

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Literatur	3
2.1.	Infektiöse Laryngotracheitis (ILT)	3
2.2.	Herpesvirusinfektionen bei Wildvögeln	5
2.3.	Herpesvirusinfektionen bei Zoovögeln	7
2.4.	Herpesvirusinfektionen bei Psittaziden	8
2.5.	Nachweismethoden	14
3.	Material und Methoden	18
3.1.	Virusstamm	18
3.2.	Eikulturen	18
3.2.1.	Bestimmung des Virustiters	19
3.2.2.	Hämagglutinationsverhalten gegen bestimmte Erythrozyten	19
3.2.3.	Präzipitationsverhalten	19
3.2.4.	Histologische Untersuchung von CAM - Läsionen	20
3.3.	Zellkulturen	20
3.3.1.	Primärzellen	21
3.3.1.1.	Hühnerembryofibroblasten	21
3.3.1.2.	Moschusentenembryofibroblasten	22
3.3.1.3.	Hühnerembryonierenzellen	22
3.3.2.	Inokulation von Sekundärzellen	22
3.3.3.	Färbung des CPE und Untersuchung auf Einschlußkörperchen	22
3.3.4.	Virustitration	22
3.4.	Physikalisch-chemische Eigenschaften des Virus	23
3.4.1.	Chloroformresistenztest	23
3.4.2.	Ätherresistenztest	23
3.4.3.	Hitzeresistenztest	23
3.4.4.	Säureempfindlichkeitstest	23
3.4.5.	Bestimmung der Nukleinsäure	24
3.4.6.	Größenbestimmung durch Filtration	24
3.5.	Plaque- und Plaquereduktionstest	24

		Seite
3.6.	Serologische Nachweisverfahren	24
3.6.1.	Indirekter Immunofluoreszenztest	24
3.6.2.	Neutralisationstest	25
3.7.	Tierversuche mit	25
3.7.1.	Amazonen	25
3.7.2.	Fasanen	25
3.7.3.	Broilerküken	26
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Virusanzüchtung in Eikulturen	27
4.1.1.	Veränderungen nach CAM-Inokulation	27
4.1.2.	Veränderungen nach AH -Inokulation	27
4.1.3.	Veränderungen nach DO -Inokulation	28
4.1.4.	Infektionsablauf	28
4.1.5.	Virustitration	29
4.1.6.	Hämagglutinationsverhalten	29
4.1.7.	Präzipitationsverhalten	29
4.1.8.	Histologische Untersuchung von CAM - Läsionen	30
4.2.	Virusanzüchtung in Zellkulturen	31
4.2.1.	Veränderungen von Hühnerembryofibroblasten	31
4.2.2.	Veränderungen von Moschusentenembryo - fibroblasten	31
4.2.3.	Veränderungen von Hühnerembryonieren - zellen	31
4.2.4.	Virustitration	31
4.2.5.	Färbung auf Einschlußkörperchen	32
4.3.	Physikalisch-chemische Eigenschaften des Virus	32
4.3.1.	Chloroformresistenztest	32
4.3.2.	Ätherresistenztest	32
4.3.3.	Hitzeresistenztest	32
4.3.4.	Säureempfindlichkeitstest	32
4.3.5.	Nukleinsäurebestimmung	32
4.3.6.	Größenbestimmung durch Filtration	33

		Seite
4.4.1.	Plaquetest	33
4.4.2.	Plaqueresistenztest	33
4.5.	Serologische Verfahren	33
4.5.1.	Indirekter Immunofluoreszenztest	33
4.5.2.	Neutralisationstest	34
4.5.2.1.	Serumverdünnungsmethode	34
4.5.2.2.	Virusverdünnungsmethode	34
4.6.	Tierversuche	35
4.6.1.	Amazonen	35
4.6.2.	Fasanen	36
4.6.3.	Broilerküken	37
5.	Diskussion	39
6.	Zusammenfassung	42
7.	Literaturverzeichnis	44
8.	Abbildungen	53

1. EINLEITUNG

Akute und chronische Infektionskrankheiten durch DNS - Viren der Familie Herpetoviridae mit einer erheblichen Mortalitätsrate sind sowohl beim Nutzgeflügel, als auch bei Zier-, Zoo- und Wildvögeln bekannt und zum Teil weit verbreitet. Besonders bei Psittaziden scheinen in den letzten zehn Jahren in zunehmendem Maße Herpesvirusinfektionen vorzukommen. In vielen Fällen handelt es sich um über lange Zeit persistierende, latente Infektionen, bei denen das Manifestwerden der Krankheit vor allem durch Streßfaktoren jeder Art begünstigt wird.

Herpesvirusinfektionen treten am häufigsten beim Nutzgeflügel auf, so bei Hühnern die Infektiöse Laryngotracheitis und die Marek'sche Krankheit, bei Enten die Entenpest und bei Puten die Putenherpesinfektion (ROLLE u. MAYR, 78; GRATZL u. KÖHLER, 68; SNOEYENBOS u.Mit.64). Bei Wild- und Zoovögeln sind Erkrankungen mit dem Eulenherpesvirus (BURTSCHER u.Mit.,66,73,75; SCHETTLER, 66,70), dem Falkenherpesvirus (GRAHAM u.Mit.,75; MARÉ u.Mit.,72,75; WARD u.Mit.,71), dem Taubenherpesvirus (SMADEL u.Mit.,45; CORNWELL u.Mit.,67,70; VINDEVOGEL u.Mit., 77,78,80; BOYLE u.Mit.,73), dem Kormoranherpesvirus (FRENCH u.Mit.,73), dem Storchenherpesvirus (KALETA u.Mit.,80) und dem Kranichherpesvirus (BURTSCHER u.Mit.,78) bekannt. Die häufigsten Herpesvirusinfektionen von Ziervögeln sind die Pacheco'sche Papageienkrankheit (PACHECO u.Mit.,30,31; RIVERS u.Mit.,31,32; FINDLAY,33), sowie weitere verlustreiche Herpesviruserkrankungen, deren Erreger zum Teil als mit dem der Pacheco'schen Krankheit identisch oder nahe verwandt gilt (KALINER,75; MATHEY, 75; SIMPSON u. Mit.,75,76; HELMBOLDT u.Mit.,76; COOPER u.Mit.,76; MARTIN,76,79; WINTEROLL,78,79; EHRSAM u.Mit.,78; VINDEVOGEL u.Mit.,77,80;RUDOLPH u.Mit.,79; KALETA u.Mit., 80; HELFER u.Mit.,80).

Das Falken-, Eulen-, Tauben- und Pacheco'sche Psittazidenherpesvirus weisen eine enge serologische Verwandtschaft auf; zwischen diesen und den Viren der Entenpest, der ILT sowie der Marek'schen Krankheit besteht keine serologische Beziehung. Die genaue Einordnung des Kormoranherpesvirus ist noch nicht geklärt (ROLLE u. MAYR, 78; VINDEVOGEL,77,80; WINTEROLL,78).

Die von mir durchgeführten Untersuchungen dienten der näheren Charakterisierung eines Herpesvirusisolates aus Organmaterial einer verendeten Blaustirnamazone (WINTEROLL,79). Das Isolat zeigte eine serologische Verwandtschaft mit dem ILT - Virus. Das verendete

Tier stammte aus einer Quarantänestation und war frisch aus Paraguay importiert worden. Zur gleichen Zeit konnten weitere ähnliche Isolate von Blaustirn-, Rotbug-, Gelbkopf- und Gelbscheitelamazonen gewonnen werden, die nach schweren respiratorischen Störungen akut verendet waren. Die Letalität lag bei etwa 32 %. Das oben aufgeführte Isolat wurde als Referenzstamm für weitere ähnliche Virusisolate genauer untersucht.

2. LITERATUR

2.1. Infektiöse Laryngotracheitis (ILT)

Die ILT, eine hochgradig kontagiöse Erkrankung des Respirationstraktes, tritt als perakute, akute, chronische sowie als klinisch inapparente Form auf. Krankhafte Veränderungen finden sich in erster Linie in Kehlkopf, Trachea, Nasen- und Nasennebenhöhlen, sowie Lungen und Bronchien. Auch Augen, Sinus Infraorbitalis, Schnabelhöhle sowie Luftsäcke können in Mitleidenschaft gezogen werden. Die erkrankten Tiere zeigen deutliche respiratorische Symptome mit Schnabelatmung, Röcheln, Aushusten von Schleim und Blut, Nasenausfluß, Konjunktivitis, Rhinitis und Sinusitis. Besonders ausgeprägt treten die Krankheitsanzeichen bei erwachsenen Tieren auf (HANSON, 78). Die natürliche Inkubationszeit beträgt 6 - 12 (HANSON 78) oder 7 - 8 Tage (GRATZL u. KÖHLER 68; ROLLE u. MAYR 78). Der Tod tritt bei perakuter Form häufig nach 4 - 5 Tagen ein, die Ansteckung erfolgt über den oberen Respirationstrakt sowie über die Augen. Die Ausscheidung des Erregers über Kot, Augensekret und Trachealschleim kann kontinuierlich oder intermittierend 16 Monate bis 2 Jahre andauern.

Bei der Sektion erkennt man im Larynx und in der Trachea eine starke Ödematisierung, Schleimabsonderung, Blutungen oder käsige Massen, die zum völligen Verschluß des Tracheallumens führen können. Die Entzündung ist im Larynx mehr hämorrhagisch bis diphteroid, in der Trachea schleimig-eitrig, pseudomembranös, diphteroid oder hämorrhagisch. Auch Bronchien, Lungen und Luftsäcke können mit Schleim, Fibrin und käsigen Massen gefüllt sein (GRATZL u. KÖHLER 68; ROLLE u. MAYR 78; HANSON 78).

Histologisch dominieren in d r Trachea Hypoplasie und bald schwere Degeneration bis zum Gewebstod der Oberflächen- und Schleimdrüsenepithelien. Heftige Ödeme und Blutungen der Submukosa führen zur völligen Ablösung der Mukosa. Eine mäßige zellige Infiltration besteht aus Lymphozyten, Histiozyten und Plasmazellen. In der frühen Krankheitsphase (2 - 6 Tage post infectionem) treten in den Epi - thelzellen eosinophile Kerneinschlußkörperchen vom Typ Cowdry A auf. Die Einschlüsse sind 1 - 20 µ groß, zeigen einen gut erkennbaren Hof (Halo,leere Zone) und sind deutlich vom randständigen Chromatin abgesetzt. Der Nukleolus ist häufig an die Kernwand gedrängt (HORZINEK 75; HANSON 78; ROLLE u. MAYR 78; GRATZL u. KÖHLER 68).

Elektronenmikroskopisch sind in den Zellkernen befallener Organe kubisch-ikosaedrische, sphärische bis helikale Nukleokapside mit etwa 162 hohlzylindrischen Kapsomeren zu erkennen. Die Nukleokapside werden von einer losen, zweilagigen Lipoproteinhülle umgeben und weisen Größen von 150 bis 170 nm (HORZINEK,75) bzw. 195 bis 250 nm (HANSON,78) auf- Auf der Oberfläche sieht man feine Projektionen. Der torusförmige Innenkörper (Core) enthält die Desoxyribonukleinsäure (DNS) mit 20 Strukturproteinen (HORZINEK,75; HANSON,78). Das ILT - Virus ist als Herpesvirus empfindlich gegenüber Lipid-Lösungsmitteln (Chloroform, Äther), gegenüber Hitze (10 - 15 Minuten bei 56°C), sowie gegenüber sauren pH - Werten (< 3). Die Virusvermehrung gelingt über embryonierte Hühner- und Puteneier (via CAM-beimpfung); Moschusenteneier, sowie Eier von Perlhühnern und Tauben sind refraktär (HANSON,78). Die Embryonen sterben teilweise 2 - 12 Tage nach der Infektion ab. Sie zeigen deutliche Lebernekrosen, Aszites und Petechien. Auf der CAM sieht man proliferative und nekrotische Plaques, Ödeme und Verdichtungen. Eosinophile Kerneinschlußkörperchen sind in Embryolebern und CAM - Veränderungen nachweisbar. ILT-Viren wachsen ebenso auf Hühnerembryofibroblasten-, Hühnerembryonieren-, Kükennieren-, Affennieren- und menschlichen Nierenzellen unter Ausbildung von Zelldegeneration und Lysis oder Synzyten- und Riesenzellbildung. Es entstehen sowohl proliferative als auch nekrotische Herde. Eosinophile Kerneinschlußkörperchen sind in den veränderten Zellen nachweisbar (GRATZL u. KÖHLER,68; MAYR, BACHMANN u.Mit.,77; ROLLE u. MAYR,78; HANSON,78).

Das Wirtsspektrum des ILT - Virus umfaßt Hühner, Fasanen, Kreuzungen zwischen beiden, Puten und Pfauen. Refraktär verhalten sich Stare, Sperlinge, Krähen, Tauben, Perlhühner, Moschusenten, sowie Hasen, Meerschweinchen und weiße Ratten (GRATZL u. KÖHLER,68; ROLLE u.MAYR, 78; HANSON,78). Der Erreger der in Japan bei Menschen auftretenden subakuten Myeloopticoneuropathie (SMON) ist vermutlich eine Variante des ILT - Virus (HANSON,78).

Nach künstlicher Infektion konnten auch bei Pekingenten histologische Veränderungen, aber keine klinischen Symptome und keine pathologischen Veränderungen der Trachea gesehen werden. Die Virusisolation gelang über embryonierte Hühnereier (CAM); es konnten neutralisierende Antikörper, jedoch keine Kerneinschlüsse nachgewiesen werden (YAMADA u. Mit.,80).

Auch Puten sind nach infraorbitaler, intratrachealer und konjunktivaler Infizierung empfänglich für das ILT- Virus und zeigen respiratorische Symptome mit Tränen- und Nasenausfluß, käsigen Massen in den Nebenhöhlen, Sinusitis und Konjunktivitis. Hier ist vor allem wie bei Fasanen der obere Respirationstrakt betroffen. Seltener und weniger stark ist der Larynx mit nekrotischen und diphteroiden Membranen bedeckt, die sich im allgemeinen nicht auf die Trachea ausdehnen. Kerneinschlußkörperchen sind nicht nachweisbar (WINTERFIELD u.Mit.,68).

2.2. Herpesvirusinfektionen von Wildvögeln

Die Herpesviren dieser Gruppe weisen eine enge serologische Verwandtschaft mit jenen von Zoovögeln und Psittaziden auf.

2.2.1. Eulenherpesvirus (Hepatosplenitis infectiosa strigorum)

Die auch als virusbedingte Einschlußkörperchenhepatitis und -lienitis bezeichnete Infektion tritt bei Großen Ohreulen, Waldohreulen, Schneeulen, Uhus (Virginia Uhu) und Alte Welt - Turmfalken auf (BURTSCHER u.Mit.,66,75; SCHETTLER, 69,70). Es wurde auch über eine Empfänglichkeit von Amerikanischen Turmfalken, Wellensittichen,Ringeltauben (WARD u.Mit.,75), sowie von Amazonen (WINTEROLL,77) berichtet. Käuze zeigen sich refraktär(SCHETTLER, 69,70). Die Erkrankung zeichnet sich durch das Auftreten von Nekroseherden am Gaumen-Rachendach, im Verdauungstrakt einschließlich Oesophagus und Drüsenmagen, in Leber und Milz, sowie teilweise im Kehlkopf und in der Lunge und entlang der Vena jugularis aus. Es wurden auch eine schleimige bis blutige Enteritis, Nekrosen und Granulome am Enddarm, sowie diphteroide Beläge am Kehlkopf beobachtet. Die Vögel sterben meist spontan ohne klinische Symptome; selten sind Mattigkeit, Freßunlust sowie gelbe Knötchen am Gaumen-Rachendach in vivo zu erkennen. Histologisch sind typische Kerneinschlußkörperchen vom Typ Cowdry A vor allem in Leberzellen in unmittelbarer Umgebung von Nekroseherden und in Retikulumzellen der Milz zu sehen. Der Virusnachweis gelingt über Eikultur, wobei Nekroseherde in Lebern und Milzen der Embryonen und kleine Proliferationen auf der CAM auftreten. In der Zellkultur verursacht das Virus einen schnell erscheinenden typischen Herpes-CPE. Nach experimenteller Infektion zeigen Waldohreulen die gleichen pathologisch-anatomischen Veränderungen wie nach natürlicher Infektion. Eine Typisierung erfolgte durch serologische Tests.

Elektronenmikroskopisch können in den veränderten Organen der Eu - lenvögel, der Hühnerembryonen, sowie auf der CAM intranukleäre Herpesviruspartikel nachgewiesen werden. Serologische Unterschiede im Neutralisationstest, sowie Abweichungen des Verhaltens in der Ei- und Zellkultur erlauben eine deutliche Abtrennung von den Viren der ILT, der Marek'schen Krankheit und der Entenpest. Einige Übereinstimmun - gen wurden mit dem Taubenherpes- und Psittazidenherpesvirus (BURTSCHER u. Mit. 65, 66, 75; BÜRKI u. Mit. 73; SCHETTLER, 69, 70)festgestellt.

2.2.2. Taubenherpes

Eine Infektion mit dem Taubenherpesvirus verläuft bei Jungtauben als meist tödliche Septikämie, bei älteren Tieren mit respiratorischen Symptomen (ROLLE, MAYR 78; VINDEVOGEL u. Mit. 77). Selten besteht zugleich ein Flügeltremor, Flugunfähigkeit und ataktischer Gang (BOYLE u. Mit. 73). Die respiratorische Form verläuft klinisch mit Dyspnoe, Rhinitis, Konjunktivitis und Bronchitis. Bei der Sektion sind diph - teroide Beläge in Rachen und Larynx und seltener Nekroseherde in Oesophagus, Leber, Milz, Pankreas, Knochenmark, Darmwand und Nieren zu sehen. Um die Nekroseherde sind meist eosinophile Kerneinschluß - körperchen vom Typ Cowdry A nachweisbar. Der Virusnachweis gelingt über Eikultur. Die verdickte CAM zeigt Nekrosen. In den teilweise verzwergten, z.T. abgestorbenen Embryonen treten Lebernekrosen auf. In Hühnerembryofibroblasten sowie in Hühnernierenzellkulturen löst das Viruswachstum Zellvergrößerungen, Proliferationen und Kernein - schlüsse aus. Der Fluoreszenztest verläuft positiv (ROLLE, MAYR 78; SIEGMANN 76; BOYLE u. Mit. 73; VINDEVOGEL u.Mit. 77). Eine Virusvermehrung gelingt auch über Entenembryofibroblasten-, Hühnerembryoleberzell- sowie Babyhamster-Nierenzellkulturen (VINDEVOGEL u.Mit.77). VINDEVOGEL (80) berichtet über ein refraktäres Verhalten von Tauben ge - genüber einem dem Pacheco'schen Virus ähnlichen Psittazidenherpesvi - rus. Es gelang ihm jedoch der Nachweis von Taubenherpesvirus in Psittaziden. Nach seinen Untersuchungen bestehen signifikante biologische und antigenetische Unterschiede zwischen diesen beiden Virusarten.

2.2.3. Falkenherpes

Das Falkenherpesvirus wurde aus natürlich infizierten Wanderfalken, Präriefalken, Amerikanischen Turmfalken und Rotkopffalken isoliert (WARD u.Mit. 71; MARÉ 73; POTGIETER u.Mit. 79) und war bei experi - mentellen Infektionen auch für alle anderen Spezies des Genus Falco,

sowie Sperber, Merline, Moschusenten, Grünreiher, Wellensittiche, Amazonen, Ringeltauben und Eulen pathogen (MARÉ 73). Es besitzt eine enge Antigenverwandtschaft mit dem Eulen- und Taubenherpes - virus. Die erkrankten Vögel sterben meist ohne klinische Symptome 4 - 6 Tage post infectionem, selten werden kurz vor dem Tod Er - brechen, Freßunlust, Zittern, Schwäche und Schläfrigkeit beobachtet. Bei der Autopsie ist die Leber stark vergrößert und weist ebenso wie Milz, Knochenmark und Dünndarmwand gelbliche Nekrose - herde auf. Typische Kerneinschlußkörperchen werden in den die Nekroseherde umgebenden Zellen festgestellt. Entzündliche Reaktio - nen fehlen fast vollständig (MARÉ u. Mit. 75; WARD u. Mit. 71). Die Virusvermehrung gelingt über Eikultur. Die CAM ist trübe, verdickt und mit weißen Herden versehen. Die verzwergten Embryonen weisen Blutungen und Ödeme,in den Lebern Nekrosen auf. In Hühner- und Entenembryofibroblasten produziert das Virus einen typischen Herpes CPE und Kerneinschlüsse. Es wird angenommen, daß die In - fektion vor allem auf oralem Weg erfolgt. Wildvögel scheinen ein Reservoir darzustellen. Experimentelle Infektionen (i.m. und in den Kropf) führten bei Sperlingsfalken zur Erkrankung, Kontakttiere blieben jedoch auch nach 6 Wochen noch gesund (WARD u. Mit. 71; MARÉ 75; POTGIETER u. Mit. 79).

2.3. Herpesvirusinfektionen von Zoovögeln

2.3.1. Kranichherpes

Eine plötzlich auftretende Krankheit wurde bei Jungfern- und Kronenkranichen, die Ähnlichkeiten mit Eulen-, Falken- und Taubenherpes - infektionen aufwies, gesehen. Die Tiere starben nach dem Auftreten von Freßunlust, Apathie und Durchfällen innerhalb weniger Tage. Pathologisch-anatomisch treten Nekrosen in Leber, Milz, Nieren, Oesophagus, Darmwand und am Gaumen, sowie diphteroide Beläge in der Schnabelhöhle und in der Darmwand auf. Nur in wenigen Fällen sind Kerneinschlüsse vom Typ Cowdry A, jedoch in allen Fällen elektronenmikroskopisch Herpesviruspartikel nachweisbar (BURTSCHER u. Mit. 78).

2.3.3. Kormoranherpes (Lake Viktoria Cormoran Virus)

Aus dem Blut eines Kormoran-Nestlings wurde ein Herpesvirus mit engem Wirtsspektrum isoliert, das keine antigenetischen Beziehungen zum Virus der IBT, der Marek'schen Krankheit, zum Tauben-, Eulen-, Puten- und Psittazidenherpesvirus aufweist. Die serologische Ein - ordnung ist noch ungeklärt, ebenso Klinik und Pathologie. Die Virus-

isolation gelang über Hühnereier (CAM) sowie nur über Kükennieren - zellen. Das Virus, das sowohl zellgebunden als auch zellfrei vor - liegt, ist durch 0,45 µ Porengröße filtrierbar und gegenüber Äther und Bromdesoxyuridin empfindlich. Auf der CAM sah man deutliche Proliferationsherde sowie Plaques und in Kükennierenzellen wenige eosinophile Kerneinschlußkörperchen (FRENCH u. Mit. 73; ROLLE, MAYR 78).

2.4. Herpesvirusinfektionen bei Psittaziden

2.4.1. Pacheco'sche Papageienkrankheit

In Brasilien wurde 1930 bei Papageienvögeln eine Krankheit beob - achtet, in deren Verlauf die Vögel innerhalb von 8 Tagen starben, nachdem sie außer Schläfrigkeit und Aufplustern des Gefieders keine weiteren klinischen Symptome gezeigt hatten. Wellensittiche, Amazonen und Eintagsküken waren für eine experimentelle Infektion empfänglich. Refraktär verhielten sich Schweine, Mäuse, Affen, Hühner, Tauben und Kanarienvögel. Pathologisch-anatomisch konnten Leber- und Nierennekrosen, histologisch eosinophile Kerneinschluß - körperchen in Leber, Milz, Niere und zum Teil in der Lunge gefun - den werden. Durch den Nachweis eines filtrierbaren Virus wurde die Abgrenzung gegen die Psittakose möglich (PACHECO u. Mit. 30, 31; RIVERS u. Mit., 31, 32; FINDLAY, 33).

2.4.2. Infektionen von Psittaziden mit Herpesviren, die Ähnlich- keit mit dem Pachecovirus haben

1975 starben in Florida aus Kalifornien importierte Aras und deren direkte Kontakttiere (Aras und Kakadus) innerhalb von 3 - 7 Tagen nach der Ankunft. Sie zeigten außer Lethargie keine klinischen Symptome und bei der Autopsie keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Die mit Organmaterial dieser Tiere infizierten Hühnerembryonen starben 5 - 8 Tage post infectionem ab und zeig - ten geschwollene, grün verfärbte Lebern mit Nekroseherden. Lokale Herde zeigten sich auf der CAM dieser Embryonen. Mit dem gleichen Material infizierte Wellensittiche starben ebenfalls. Hühner und Mäuse verhielten sich refraktär. Das isolierte Virus passierte Filter mit 0,22 µ Porengröße. Nach Filtration durch 0,1 µ Poren - größe und Ätherbehandlung war die Vermehrungsfähigkeit des Virus

aufgehoben. Lichtmikroskopisch konnten in Lebern und in CAM - Plaques Kerneinschlußkörperchen, elektronenmikroskopisch eine Verdickung der inneren Kernmembran sowie Herpesviruspartikel nachgewiesen werden (SIMPSON u. Mit. 75).
Ein Jahr später konnte eine Herpesvirusätiologie bei weiteren Todesfällen bei Großpapageien bestätigt werden. Einige von ihnen zeigten vor dem Verenden eine Sinusitis mit Nasenausfluß. Zu diesem Zeitpunkt wurde vermutet, daß das bloße Nukleokapsid in den Lebersinusoiden das eigentliche infektiöse Agens darstellt. Eine Vakzination der Vögel mit dem Virus der Marek'schen Krankheit und einem Putenherpesvirus beeinflußte die Anfälligkeit gegen - über einer experimentellen Infektion (SIMPSON u. Mit. 76) nicht.

Frisch importierte Graupapageien aus Ghana starben kurz nach ihrer Ankunft in Kenya. Sie zeigten kurz vor dem Verenden einen leich - ten Nasenausfluß, gesträubtes Gefieder und waren apathisch. In einem Fall konnten Hyperämie, Leberschwellung und -nekrosen festgestellt werden, die ähnlich wie bei der Pacheco'schen Krankheit aussahen. In zahlreichen Leberzellkernen gelang der Nachweis von eosinophilen Einschlußkörperchen (KALINER 75).
HELMBOLDT u. Mit. berichteten 1977 über zwei Kakadus, eine Ama - zone und einen Wellensittich, die nach kurzer Krankheit starben. In den Gallengangsepithelien und Hepatozyten der Leber konnten wie auch in Nekroseherden der roten Pulpa und Retikulumzellen der Milz wenige Kerneinschlußkörperchen nachgewiesen werden (HELMBOLDT u. Mit. 77).
Im gleichen Jahr wurden in Kalifornien Krankheiten bei verschie - denen Agaporniden- und Sittichspezies, einem Bartsittich und mehreren Halbmond-Konuren (Eupsittula canicularis) festgestellt, die perakut verliefen, wobei die Tiere oft von einem Tag auf den anderen starben und außer Apathie, geschlossenen Augen und auf - geplustertem Gefieder keine klinischen Symptome zeigten. Bei der Sektion sah man geschwollene, helle Lebern mit Blutungen und Ne - krosen, getrübte, feuchte Luftsäcke sowie vergrößerte, z.T. schwarz verfärbte Milzen. Lichtmikroskopisch konnten in Leber und Milz Ne - krosen und Kerneinschlußkörperchen, elektronenmikroskopisch Herpesviruspartikel nachgewiesen werden. Die Isolierung eines ätheremp - findlichen Virus erfolgte über Hühnereikulturen. Die Embryonen

starben innerhalb von 6 Tagen, waren verzwergt, haemorrhagisch und ödematös. Bei experimenteller Infektion erwiesen sich Wellensittiche, Agaporniden, Nymphensittiche, Kakadus und weitere Sittich- und Amazonenspezies empfänglich. Refraktär verhielten sich Finkenvögel, Eintagsküken und -puten sowie Hühner. Die Frage der Epidemiologie blieb unbeantwortet. Bei all diesen Herpesvirusinfektionen weisen die Autoren auf die Ähnlichkeit des Virus und der Symptomatik mit der der Pacheco'schen Krankheit hin. In den meisten Fällen liegt aber keine serologische Testung der Virusverwandschaft vor. Das gilt auch von dem Bericht EHRSAM/Schweiz,(1978) über eine Krankheit bei importierten Kakadus, bei der zusätzlich zu den bereits beschriebenen Symptomen Krämpfe im Hals-, Flügel- und Beinbereich und blutiger Durchfall auftraten. Hierher gehört auch der Bericht von MARTIN u. Mit. (79) aus England über ein perakutes Sterben von frisch aus Singapore und Argentinien importierten Aras, Kakadus und Papageien. Das aus den toten Vögeln über Eikultur isolierte Herpesvirus wurde nur vom homologen und nicht durch ein Antiserum gegen Taubenherpes oder Infektiöse Laryngotracheitis (ILT) neutralisiert. Weiterhin waren hier die von RUDOLPH u. Mit. (79) bei einem Graupapagei und Alexandersittich festgestellte Virushepatitis und die aus Schottland von RANDALL u. Mit. (79) mitgeteilten Erkrankungen von 2 Amazonen einzuordnen, bei denen allerdings zusätzlich eine Konjunktivitis vorlag. Diese beobachteten KALETA u. Mit. (1980) nicht, die ein Herpesvirus aus den von Paraguay importierten Amazonen isolierten. Die Tiere zeigten bei der Autopsie Veränderungen von Lebern, Milzen sowie der Drüsenmagen- und Dünndarmschleimhaut. Die Virusisolierung gelang über Hühnerembryofibroblastenkulturen, eine Neutralisation mit dem homologen Antiserum war möglich.
Eindeutig haben nur MILLER u. Mit. (79) die Verwandtschaft ihres aus plötzlich in Texas verendeten Amazonenspezies, Kakadus und Nymphensittichs isolierten Herpesvirus mit dem Pacheco-Virus serologisch bewiesen. Klinisch lagen neben Apathie Durchfallserscheinungen vor. Der pathologisch-anatomische und histologische Befund stimmt mit dem der oben erwähnten Fälle überein.

Hiervon zu unterscheiden sind die Fälle, bei denen bei gleichem Krankheitsverlauf und gleicher Symptomatik ein Herpesvirus isoliert wurde, das serologisch eine gewisse Verwandtschaft mit dem Taubenherpesvirus zeigt. Zu nennen ist in diesem Zusammenhang der Bericht von WINTEROLL (77) über Herpesvirusinfektionen bei verschiedenen Königssittichen, Kakadus, Amazonen, Mohrenkopf - papageien, Zwergaras, Graupapageien und Strichelloris aus Quarantänestationen und Zoogeschäften.
Aus Frankreich wurde bei Nymphensittichen, die 2 Tage nach Auf - treten von Apathie und Flügelzittern starben, von einem Pacheco ähnlichen Fall berichtet. Die Milzen waren vergrößert, die Lebern zeigten depigmentierte Areale sowie histologisch eine nekrotisierende Hepatitis mit intranukleären Einschlußkörperchen, die auch in Hühnerembryofibroblastenzellkulturen auftraten. Der CPE glich dem des Taubenherpesvirus, mit dem auch im Neutralisationstest eine Kreuzreaktion festgestellt wurde. Elektronenmikroskopisch waren Herpesviruspartikel nachweisbar. Nachdem MARÉ u. Mit. (73) bereits eine serologische Beziehung zwischen Eulen-, Tauben- und Falkenherpesvirus erkannten, wird vermutet, daß das Psittaziden - herpesvirus einen zusätzlichen Typ eines einheitlichen Vogelher - pesvirus darstellt (VINDEVOGEL u. Mit. 78). Später haben aller - dings VINDEVOGEL u. Mit. (1980) bei einem Vergleich zwischen 3 Psittazidenherpesisolaten und einem Taubenherpesstamm aufgrund des Wachstums auf Hühnerembryofibroblasten, der Plaquebildung und Neutralisation, sowie von Tierversuchen festgestellt, daß das Virus der Pacheco'schen Krankheit und das Taubenherpesvirus zwei verschiedenen Herpesvirusgruppen angehören. Wellensittiche können zwar auch für das Taubenherpesvirus empfänglich sein, die Taube jedoch nur für ihr eigenes Virus. Diesen mit der Pacheco-Virus- infektion ähnlichen Herpesvirusinfektionen ist gemeinsam, daß sie vorwiegend bei Großpapageien, die dem Streß einer langen Reise und Umweltveränderung ausgesetzt waren, zu Krankheiten und Tod führen. Auf dieser Basis erfolgt eine so starke Virusvermehrung und Ausscheidung, daß auch Kontakttiere erkranken und sterben. Hiervon einwandfrei abzutrennen ist eine weitere Herpesvirus - infektion, die besonders bei Amazonen auftritt und von WINTEROLL (79) erstmals beschrieben wurde.

Rotbug-, Blaustirn- und Gelbscheitelamazonen aus Paraguay erkrankten 5 - 6 Tage nach ihrer Ankunft in einer Quarantänestation. Sie zeigten einen deutlich reduzierten bis sehr schlechten Ernährungszustand. Augen- und Nasenöffnungen der Tiere waren meist dick mit Sekret verklebt. Es bestand mühsame Schnabelatmung mit Röcheln, die Schnabelhöhle enthielt zum Teil schleimige Massen. Pathologisch - anatomisch lagen eine Rhinitis, eine Laryngitis und Pharyngitis sowie eine Tracheitis vor. Die Entzündungen verliefen serös bis mukös, fibrinös, diphteroid, pseudomembranös oder granulomatös und zum Teil hämorrhagisch. Die Lumina der Tracheen waren teilweise mit Schleim, teilweise mit fibrinösen Massen dick vollgestopft. Dazu bestand eine fibrinöse Bronchopneumonie mit starken Ausgüssen in den Bronchien und Bronchioli. Unregelmäßig konnten zusätzlich eine Konjunktivitis, Blepharitis, Glossitis, Ingluveitis und Aerosaccu - litis beobachtet werden. Histologisch konnte in der Trachea eine Epithelzellhyperplasie mit Ausbildung vielschichtiger Epithellagen sowie eine ballonierende Epithelzelldegeneration und -desquamation mit umfangreichen Fibrinauflagerungen beobachtet werden. Die Schleimdrüsen waren prall gefüllt und teilweise einer schleimigen Degeneration anheim gefallen. Soweit das Schleimhautepithel der Trachea noch vorhanden war, konnten selten in den frühen Krankheitsphasen Kern - einschlußkörperchen nachgewiesen werden. In den Bronchien bestand ebenfalls eine Epithelzelldesquamation sowie eine zellige Infil - tration. Im Lungenparenchym lagen Hämorrhagien und Emphyseme, in der Leber eine Stauungshyperämie vor. Aus Organmaterial konnte ein Virus isoliert werden. Bei Eikulturanzüchtung wurden bei den Em - bryonen Aszites, Petechien und Lebernekrosen sowie Proliferationen und Blutungen auf der CAM festgestellt. Das Virus verursachte in sekundären Hühnerembryofibroblasten auch nach Filtration durch 0,22 und 0,45 µ Porengröße einen CPE in Form bräunlich pigmentierter Verdichtungsherde. Elektronenmikroskopisch wurden Herpesviruspartikel nachgewiesen. Im Präzipitationstest bestand eine Verwandtschaft mit ILT. Eintagsküken wurden intraokulär oder intratracheal, 4 1/2 Wochen alte Küken und 10 Wochen alte Junghühner mit beiden Metho - den gleichzeitig infiziert. Es konnten teilweise schwere histolo - gische Veränderungen in Trachea, Larynx, Lunge und Leber ermittelt werden. Der Virusnachweis war in jedem Fall positiv, serologische Untersuchungen (Neutralisationsteste) verliefen negativ (WINTEROLL,79).

Mit einem dieser Virusisolate wurde die vorliegende Arbeit durchgeführt. Während dieser Arbeit wurde eine vorläufige Mitteilung von HELFER u. Mit. (1980) bekannt, der aus einem verendeten Bourkesittich mit Lungen- und Luftsackveränderungen ein Herpesvirus ermittelte, von dem er annimmt, daß es eine Variante des ILT-Stammes sein könnte.

2.5. Virusnachweismethoden

2.5.1. Nachweis von Herpesviren mithilfe von Eikulturmethoden

Geflügelherpesviren, insbesondere das ILT-Virus, aber auch Psittazidenherpesviren, vermehren sich sehr gut im embryonierten Hühnerei. Das Mittel der Wahl ist die Inokulation auf die Chorioallantois - membran (CAM) bei einer Bebrütungsdauer von 9 - 11 Tagen. Auf der CAM entstehen teils proliferative, teils nekrotische Herde, die vorwiegend entlang von Gefäßen auftreten und 6 - 7 Tage post in - fectionem ihre maximale Ausdehnung erreichen. Eine Ödematisierung und Verdickung der CAM gehört ebenfalls zu den durch Herpesviren ausgelösten CAM - Veränderungen. Die Embryonen, die teilweise ab - sterben, zeigen Lebernekrosen, Aszites und über den ganzen Körper verteilte Petechien (ROLLE, MAYR 78; WINTEROLL 77,79; MAYR, BACH-MANN u. Mit. 77; SIMPSON u. Mit. 75, 76; RANDALL u. Mit. 79; HITCH-NER u. Mit. 78). Auch nach Inokulation in den Dottersack (DO) und in die Allantoishöhle (AH) können abgestorbene Embryonen mit grün - lichen, geschwollenen Lebern und Lebernekrosen (SIMPSON u. Mit.75,76; RANDALL u. Mit. 79) oder verzwergte,haemorrhagische Embryonen mit Aszites (COOPER u. Mit. 77; MILLER u. Mit. 79) festgestellt werden. Nach Färbung der CAM mit Hämatoxylin und Eosin oder Giemsa sind in den nekrotischen Gebieten und deren Umgebung Kerneinschlußkörperchen nachweisbar (SIMPSON u. Mitt. 75; WINTEROLL 77). HITCHNER u. Mit. (79) gab als Mittel der Wahl zur Isolierung der Psittazidenviren die Eiinokulation auf die CAM an.

2.5.2. Nachweis von Herpesviren mithilfe von Zellkulturmethoden

Psittazidenherpesviren vermehren sich am besten in Hühnerembryo - fibroblasten- und Hühnerembryonierenzellen (HIRAI u. Mit. 78), ILT - Viren in Hühnerembryofibroblasten-, Hühnernieren-, Kükennieren-, Affennieren- sowie in embryonalen menschlichen Nierenzellen (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77; ROLLE, MAYR 78). Der cytopatische Effekt (CPE) äußert sich in Zelldegeneration und Lysis oder Synzytien- und Rie-senzellbildung. In den veränderten Zellen sind intranukleäre Ein - schlußkörperchen nachweisbar (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77; ROLLE, MAYR 78; EHRSAM u. Mit. 78; VINDEVOGEL u. Mit. 78). Es kann auch zur Abkugelung von Zellen, zu herdförmiger Zusammenballung, zur Ablösung des gesamten Zellrasens (MARTIN u. Mit. 79) sowie zur Aus-

bildung proliferativer Plaques und herdförmiger, granulierter Zellhaufen kommen (RANDALL u. Mit. 79; WINTEROLL 79; KALETA u. Mit. 80).

2.5.3. Methoden zur Charakterisierung von Herpesviren

Bei Herpesviren, als behüllte Viren, liegt eine Empfindlichkeit gegenüber Lipidlösungsmittel wie Chloroform und Äther vor. Wird durch diese Substanzen die Lipidhülle zerstört, dann geht die Infektiosität verloren (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77; ROLLE, MAYR 78; HIRAI u. Mit. 80). Diese Methode wurde bereits vielfach zur Charakterisierung von Psittazidenherpesviren angewendet (SIMPSON u. Mit. 75; COOPER u. Mit. 77; EHRSAM u. Mit. 78; VINDEVOGEL u. Mit. 78; MARTIN u. Mit. 79; RANDALL u. Mit. 79; KALETA u. Mit. 70).
Da Herpesviren DNS-Viren sind, führt eine Blockierung der DNS - Synthese zum Titerabfall. Hierzu finden halogenierte Uridine, wie das 5-Joddesoxyuridin (JUDR) Anwendung, die den Einbau des Thymidins in die DNS verhindern (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77; HIRAI, u. Mit. 78; MARTIN u. Mit. 79; KALETA u. Mit. 80).
Die Säureempfindlichkeit (bei pH 3) ist ein weiteres Charakteristikum von Herpesviren. Bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten kommt es zum Erlöschen der Infektiosität (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77; ROLLE, MAYR 78; HIRAI u. Mit. 78).
Das gleiche Ergebnis tritt nach 30-minütiger Hitzeeinwirkung bei 56°C auf (ROLLE, MAYR 78). HIRAI u. Mit. (78) konnten bereits nach 5 Minuten einen starken Titerabfall, nach 10 Minuten das Fehlen der Infektiosität erkennen.
Die Größe von Herpesviren liegt zwischen 150 und 179 nm (0,15 - 0,18 µ). Bei Filtrationsversuchen mit Membranfiltern passieren sie demnach eine Porengröße von 0,45 und 0,22 µ, nicht jedoch von 0,1 und 0,05 µ (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77; HIRAI u. Mit. 79).
Der Hämagglutinationstest mit Hühnererythrozyten ist negativ bei Herpesviren. Damit läßt sich eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Ortho- und Paramyxoviren ausschließen (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77).
Typisch für Herpesviren ist auch das Auftreten eosinophiler Kerneinschlußkörperchen von Typ Cowdry A. Sie treten in den Zellen pathologisch veränderter Organe erkrankter und verendeter Vögel, in den Zellen veränderter Embryoorgane und CAM-Abschnitten in - fizierter Hühnereier sowie in infizierten Zellkulturen auf und

sind lichtmikroskopisch nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin sichtbar (ROLLE, MAYR 78; SIMPSON u. Mit. 75, 76; KALINER 75; HELMBOLDT u. Mit. 77 ; COOPER u. Mit. 77 ; WINTEROLL 77 ; EHRSAM u. Mit. 78; VINDEVOGEL u. Mit. 78 ; MARTIN u. Mit. 79; RANDALL u. Mit. 79 ; KALETA u. Mit. 80 ; HELFER u. Mit. 80). Elektronenmikroskopisch sind sphärische und helikale Herpes - viruspartikel im Negativkontrastverfahren sowohl in Zellkernen infizierter Organe und Zellkulturen als auch im Zytoplasma nachweisbar. Bei erstem handelt es sich um nacktes, bei letzterem um behülltes Virus (HIRAI u. Mit. 78 ; ROLLE, MAYR 78).

2.5.4. Serologische Nachweisverfahren

Serologische Tests dienen dem Nachweis von Antigen-Antikörper - reaktionen zwischen homologen Partnern. Die bekanntesten Ver - fahren zum Nachweis von Herpesviren sind der Immunofluoreszenz-test, der Agargelpräzipitationstest (AGP), der Neutralisations-test sowie der Plaquereduktionstest.
Der Immunofluoreszenztest dient dem Nachweis einer spezifischen Antigen-Antikörperbindung. Dieser Prozeß wird durch Kopplung der Antiseren an einen fluoreszierenden Farbstoff, der im UV - Licht des Mikroskops aufleuchtet, sichtbar gemacht. Keine Re - aktion tritt bei heterologen Antiseren auf (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77 ; WINTEROLL 79).
Ein weiteres Charakteristikum von Herpesviren ist das Auftreten teils lytischer, teils proliferativer Plaques unter agarhaltigem Overlay-Medium in infizierten Zellkulturen. Sie können durch Färbung mit Neutralrot sichtbar gemacht werden (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77 ; KALETA u. Mit. 80).

Der AGP bzw. Immunodiffusionstest beruht auf der Diffusion von Antigen und Antikörpern von zwei getrennten Depots aus im halb - festen Agarmedium. Treffen zwei homologe Reaktionspartner auf - einander, so kommt es im Äquivalenzbereich zur Ausbildung einer weißen Präzipitationslinie (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77).

Beim empfindlicheren, typspezifischen Neutralisationstest wird die Viruswirkung in einem System durch die Bindung an ein homo - loges Antiserum aufgehoben bzw. neutralisiert. Als Indikatorsysteme

dienen embryonierte Hühnereier oder Zellkulturen (MAYR, BACHMANN u. Mit. 77 ; ROLLE, MAYR 78).

Eine abgewandelte Form des Neutralisationstests stellt der Plaque - reduktionstest anhand der Agar-Overlay-Technik dar. Durch die Bin - dung des Antigens an ein homologes Antiserum kommt es zu einer mehr oder minder starken Reduzierung der Plaquezahl im Vergleich zum Virus-kontrollansatz. Hierdurch kann auch eine partielle Reduzierung der Infektiosität gemessen werden, was vor allem bei Viren, die nicht vollständig neutralisiert werden, so z.B. bei Herpesviren, Anwen - dung finden. Diese serologischen Tests wurden bereits häufig bei der Diagnostik von ILT- und Psittazidenherpesviren angewendet (ROLLE, MAYR 78 ; VINDEVOGEL 78, 80 ; MARTIN u. Mit. 79 ; WINTEROLL 79 ; KALETA u. Mit. 80 ; GRATZL, KÖHLER 68).

2.5.5. Verhalten in Versuchstieren

Die Charakterisierung von Geflügelherpesviren durch Tierversuche wird durch Ei- und Zellkulturmethoden weitgehend verdrängt. Zur Festlegung des Wirtsspektrums des Erregers und zum Studium der Pathogenese kann nicht darauf verzichtet werden.
Hauptwirte des ILT-Virus sind Hühner, Küken, Fasane und junge Pu - ten. Die Inkubationszeit der experimentellen Infektion beträgt beim Huhn 2 - 4 Tage, bei Kontaktinfektion 7 - 8 Tage; die Symptome entsprechen denen einer natürlichen Infektion nach abgekürzter Inku - bationszeit. Infektionsmodi sind die Verabreichung in den Infra - orbitalsinus, die intratracheale, intranasale, intraokkuläre, intraabdominale, intravenöse und subkutane Inokulation sowie die Kontaktinfektion. Die Virusausscheidung von genesenen Tieren erfolgt 16 Monate und länger. Bei künstlicher Infektion verläuft die Krankheit bei einer mäßigen Infektionsdosis etwa wie folgt:

3. Tag post infect.	Laryngitis, Pharyngitis
4. Tag post infect.	Befall von Syrinx u. Bronchien
6. Tag post infect.	Diphteroide Membranen in Larynx u. Trachea
8.-10.Tag p.infect.	Pfropfbildung in Larynx u. Trachea.

Kerneinschlußkörperchen sind vom 2. - 6. Tage post infectionem nachweisbar.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Virusstamm

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Virusisolat 1471/78 wurde aus Trachea, Leber, Lunge, Milz und Niere einer Blaustirnamazone (amazona aestiva) isoliert, die kurz nach dem Import aus Paraguay in einer Quarantänestation verendet war. Das Isolat wurde über Hühnerembryofibroblasten vermehrt (= Tc 129).

3.2. Eikulturen

Für die Virusanzüchtung auf dem Wege der Eikultur wurden spezifisch-pathogenfreie (SPF)Hühnereier teils von der Firma Lohmann, teils aus den institutseigenen SPF-Herden verwendet. Aus dem homogenisierten Organmaterial der Blaustirnamazone wurde mit steriler, 0,85%iger Natriumchlorid (NaCl) - lösung eine 20%ige Suspension bereitet und der nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 2250 g verbliebene Überstand mit einer Penicillin-Streptomycinlösung (2 ml auf 8 ml Organsuspension) versetzt. Davon wurden pro embryoniertes Hühnerei 0,2 ml inokuliert. Die Inokulation erfolgte auf dreierlei Art: auf die ungesenkte Chorioallantoismembran (CAM) bei einer Vorbebrütung von 9 - 11 Tagen, in die Amnioallantoishöhle (AH) von 8 - 10 Tage alten Embryonen sowie in den Dottersack (DO) von 6 - 7 Tage alten Embryonen. Die infizierten Hühnereier wurden 6 (CAM), 5 (AH) bzw. 7 (DO) Tage bei 37°C inkubiert. Pro Passage wurden 4 embryonierte Hühnereier verwendet. Das Abtöten der Eier erfolgte durch 30-minütige Kälteeinwirkung von - 20°C. Um den Infektionsablauf beobachten zu können, wurden mit der CAM-Inokulationsmethode 24 Hühnereier infiziert und täglich vom 2. - 6. Tag post infectionem je 2 Eier untersucht.

Zur Auswertung wurden die abgetöteten Hühnereier steril geöffnet, Embryonen, CAM sowie Amnioallantoisflüssigkeit (AAF) steril entnommen und Embryonen wie CAM makroskopisch auf Veränderungen geprüft. Für Subpassagen wurden homogenisierte CAM und AAF 2 : 1 gemischt, 10 Minuten zentrifugiert (2250 g), mit Antibiotikum versetzt (1 ml + 9 ml) und auf weitere 4 Hühnereier verimpft.

3.2.1. Bestimmung des Virustiters

Das Virusisolat wurde bei jedem Verimpfungsmodus in Zehnerpotenzen mit 0,85 %iger NaCl verdünnt (10^{0} bis 10^{-5}) und in der oben beschriebenen Weise inokuliert. Die Auswertung erfolgte anhand von Embryo- und CAM-Veränderungen. Zum Vergleich wurden nicht infizierte Kontrollembryonen herangezogen.

3.2.2. Hämagglutinationsverhalten gegen Hühnererythrozyten

Die AAF wurde zu gleichen Teilen mit einer 10 %igen Hühnererythrozytensuspension auf entfetteten Objektträgern vermischt und für zwei Minuten inkubiert (Objektträgerschnellagglutination). Als positiver Vergleich diente ein Newcastle-Disease-Virus-Stamm.

3.2.3. Präzipitationsverhalten

Hierzu wurde der Agargelpräzipitations- bzw. Immunodiffusionstest nach Ouchterlony in Form der Mikromethode mit halbfestem Agarmedium angewandt. Als Testantigen diente CAM-Material, das mit 0,85%iger steriler NaCl gewaschen und homogenisiert wurde. Getestet wurde gegen die positiven Hyperimmunseren von Newcastle Disease, Reo, Adeno, Psittazidenpocken, Eulenherpes, ILT sowie ein von Dr.Th. Smitt aus Doorn zur Verfügung gestelltes Pacheco-Antiserum. Für jedes Antiserum wurde ein Kontroll-Antigen mitgeführt. Der Test wurde für 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37^{o}C inkubiert und 1 - 2 weitere Tage bis zum endgültigen Auswerten bei Zimmertemperatur belassen. Das Ablesen der Präzipitationsbanden erfolgte im indirekten Licht.

Zusammensetzung des Agars:
1,7 g Bacto-Agar (Difco)
100 ml 8 %ige NaCl (pH 7,2 - 7,4)
4 % Polyethylenglycoll (PEG)
MG 6000 - 7000.

Zubereitung des Agars:
Aus zerkleinertem Bacto-Agar und PEG wurde mit 100 ml 8%iger NaCl eine Mischung hergestellt, die 15 Minuten bei 100^{o}C und 1 bar autoklaviert wurde. Durch die Zugabe von PEG wird die Ausbildung der Präzipitationsbanden deutlicher. Der noch warme Agar wird auf Glasplatten ausgegossen und erstarrt beim Erkalten. Die Schichtdicke beträgt 2 mm. Mit einer Depotschablone von 3 mm Depotdurch-

messer und 2 mm Depotabstand wurden die Vertiefungen für Antigene und Antiseren ausgestanzt.

Färbung der Präzipitationsbanden:
Der Agar wurde 24 Stunden in Phosphatpuffer (PBS, 0,01 M; pH 7,0) gewaschen und mit einer Mischung aus
1 g Amidoschwarz 10 B,
500 ml 98%iger Methylalkohol,
400 ml aqua dest.,
100 ml Eiessig
gefärbt. Der Agar wurde mit 2%iger Essigsäure entfärbt, eine positive Reaktion wird als blaue Linie sichtbar.

3.2.4. Histologische Untersuchung von CAM-Läsionen

Die CAM wurde mit 0,85%iger NaCl gewaschen, in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom in einer Schichtdicke von 7-8 µ geschnitten und nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin mikroskopisch auf Kerneinschlüsse untersucht.

3.3. Zellkulturen

Materialien: Kulturflaschen nach Roux (für Primärzellen)
Oberflächenbehandelte Petrischalen und Mikro - platten aus Polysterol (Fa. Greiner) (für Se - kundärzellen)

Reagentien: steriler Ca^+ und Mg^+ freier PBS-Puffer, pH 7,3
0,25%iges Trypsin, verdünnt mit PBS
Trypsin-Versen-Mischung (MAYR, BACHMANN u. Mit.77).

Medium für Hühnerembryo- und Moschusentenembryofibroblasten:
Medium 199, F 10 (Difco)
Earle's A : 68 g NaCl
4 g KCl
1,65g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$
22 g $NaHCO_3$
10 g Glucose
1000 ml aqua bidest.

Earle's B : 4 g CaCl
4,08 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
1000 ml aqua bidest.

In 500 ml Erhaltungs- bzw. Wachstumsmedium sind enthalten:

0,62 g LAH (TC Lactalbumin Hydrolysate, Bacto)
0,375g TPB (Tryptose Phosphate Broth, dehydrated)
1,26 g F 10 (TC Medium HAM F 10, dried)
1,374g 199 (TC Medium 199, dried)
4 % Earle's A
2 % Earle's B
0,35 g Bikarbonat
3 % fötales Kälberserum, Erhaltungsmedium (Seromed)
5 % fötales Kälberserum, Wachstumsmedium (Seromed)

Medium für Hühnerembryonierenzellen:

9 ml Medium 199, F 10 (Flow)
10ml TPB (Flow)
4 ml 2,1%iges $NaHCO_3$
0,14 ml Hepes Puffer (Flow)
10ml fötales Kälberserum (Seromed)
66,6 ml aqua bidest
0,5 ml Vitamine Mixture (Flow)
1 ml (Penicillin 10^6 I.E.) in 20 ml Hanks (Flow)
(Streptomycin 1 g)
0,1 ml Pimafucine (1 ml + 4 ml Hanks).

Alle Medien werden steril filtriert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Primärzellkulturen wurden bis zum vollständigen Anwachsen des Zellrasens 48 Stunden im geschlossenen System bei 37°C, Sekundärzellen bei hoher Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2-Zufuhr bei 37°C im offenen System belassen. Inokulation des Virus erfolgte stets auf Sekundär - zellen.

3.3.1. Primärzellen

3.3.1.1. Hühnerembryofibroblasten (FHE)

FHE-Zellen wurden aus Embryonen 9-tägiger embryonierter SPF -

Hühnereier nach Entfernen von Augen, Flügeln, Beinen und inneren Organen gewonnen. Die Embryonen wurden mechanisch zerkleinert, durch fraktionierte Trypsinbehandlung aufgeschlossen und nach 20-minütigem Zentrifugieren bei 600 g in Wachstumsmedium aufgenommen. Primärkulturen wurden 48 Stunden in Roux-Flaschen angezüchtet, mit einer Trypsin-Versen-Mischung abgelöst und als Sekundärzellen in oberflächenbehandelte Schälchen und Mikroplatten ausgesaet.

3.3.1.2. Moschusentenembryofibroblasten (FME)

Primärzellen wurden aus 12-16-tägigen SPF-Moschusentenembryonen wie FHE-Kulturen hergestellt. Eine Subkultivierung war jedoch erst nach 2 - 3 Tagen möglich, da erst dann der Zellrasen eine entsprechende Dichte erreichte.

3.3.1.3. Hühnerembryonierenzellen

Die Nieren 18-tägiger SPF-Embryonen wurden steril entnommen und durch verschiedene Trypsinierungsschritte aufgeschlossen. Das Zellsediment wurde erst nach zweimaligem Zentrifugieren (jeweils 10 Minuten) bei 600 g in Wachstumsmedium aufgenommen. Das Auswachsen der Primärzellen dauerte ebenfalls 2 - 3 Tage.

3.3.2. Inokulation von Sekundärzellen

24 Stunden alte Sekundärzellen wurden nach Abhebern des Mediums mit 0,2 ml Virusmaterial infiziert und nach 30-minütiger Adsorption bei 37°C und 5 % CO_2 mit Erhaltungsmedium beschickt. Der auftretende cytopathische Effekt (CPE) wurde bis zu 6 Tagen post infectionem ausgewertet, jeden 2. Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.3.3. Färbung des CPE und Untersuchung auf Einschlußkörperchen

Die Präparate wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen, mit Bouin'scher Lösung fixiert und mit Alkohol gewaschen. Nach Spülen mit aqua dest. erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxylin nach Delafield und mit 0,35 %igem Eosin (MAYR, BACHMANN u. Mit.77).

3.3.4. Virustitration

Mit PBS wurden Virusverdünnungen in lög 10 Stufen von unverdünnt bis 10^{-5} hergestellt und auf 24 - 48 stündige Sekundärzellen in

Petrischalen und Mikroplatten inokuliert. Die endgültige Auswertung erfolgte 6 Tage (Erstauswertung am 3. Tag) post infectionem. Der Virustiter (KID_{50}) wurde nach REED und MUENCH berechnet.

3.4. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Virus

3.4.1. Chloroformresistenztest

Die Virussuspension wurde mit 10 % Chloroform pro analysi versetzt, 30 Minuten bei 4°C geschüttelt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Nach 30 - 45 minütigem Zentrifugieren bei 2200 g wurde der Überstand als gereinigtes Virusmaterial gewonnen. Hiervon wurden log 10 Verdünnungsstufen (10^{0} bis 10^{-5}) angelegt und pro Stufe 4 Schälchen mit 24 - 48 stündigen sekundären FHE-Zellen inokuliert. Gleichzeitig wurden eine positive Kontrolle ohne Chloroform und eine Zellkontrolle angesetzt. Die endgültige Auswertung erfolgte nach 3 Tagen.

3.4.2. Ätherresistenztest

Die Virussuspension wurde mit 10% Äther versetzt, bei 4°C geschüttelt und über Nacht inkubiert. Nach Verdampfen des Äthers bei Zimmertemperatur wurde vom Restmaterial eine Verdünnungsreihe angelegt, zusammen mit einer unbehandelten Kontrolle auf FHE-Zellen titriert und nach 3 Tagen ausgewertet.

3.4.3. Hitzeresistenztest

Hierzu wurde die Virussuspension in log 10 Verdünnungsstufen bei 56°C für 15, 30 und 60 Minuten im Wasserbad inkubiert und anschließend zusammen mit Kontrollen wie oben erwähnt auf FHE-Zellen getestet.

3.4.4. Säureempfindlichkeitstest

Das Virusisolat wurde bei pH 3,6 und 8 getestet. Die einzelnen pH-Stufen wurden durch verschiedene Mischungsverhältnisse der Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure; 21,008 g/l) und der Stammlösung B (0,2 M Na_2HPO_4 x 2 H_2O nach Sörensen; 35,65 g/l) des Mc-Ilvaine-Puffers erreicht.

pH	Stammlösung A (ml)	Stammlösung B (ml)
3	15,89	4,11
6	7,37	12,63
8	0,55	19,45

Pufferlösung und Virussuspension wurden 1 : 10 gemischt und nach 30-, 60- und 180-minütiger Inkubation bei 37°C auf sekundäre FHE-Zellen inokuliert.

3.4.5. Bestimmung der Nukleinsäure

Hierzu wurden als Stammlösung 1 mg 5-Joddesoxyuridin (JUDR;Sigma) pro ml Virusmedium aufgelöst. Diese wurde im Verhältnis 1 : 10 mit Virusmedium verdünnt und enthielt 100 µg JUDR/ml. Infizierte se - kundäre FHE-Kulturen wurden nach 30-minütiger Adsorption mit JUDR-haltigem Medium beschickt. Als Kontrollen wurden Proben mit JUDR-freiem Medium, ein bekanntes DNS- und ein bekanntes RNS-Virus mitgeführt. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C, täglich wurden 2 Proben bis zur völligen Zellzerstörung nach 6 - 8 Tagen entnommen und auf frische FHE-Zellen titriert.

3.4.6. Größenbestimmung durch Filtration

Die Virussuspension wurde hierzu durch ein mit Kälberserum vor - behandeltes Millipore-Filter von 0,1, 0,22 und 0,45 µ Porengröße filtriert und anschließend auf sekundäre FHE-Zellen titriert.

3.5. Plaque- und Plaquereduktionstest

Zur Ermittlung der Virusdosis, bei der etwa 100 Plaques pro Schälchen ausgezählt werden können, wurden sekundäre FHE-Zellen mit steriler PBS gewaschen, 30 Minuten bei 37°C mit 0,2 - 0,5 ml Virussuspension in log 10 Verdünnungsstufen inkubiert, mit PBS gewaschen und mit 5 ml agarhaltigem Overlay-Medium (Arbeitstem - peratur 42°C; Mischungsverhältnis Agar: Overlay 1 : 1) pro Schälchen beschichtet. Die Auszählung der Plaques erfolgte nach 5 - 6 Tagen bei Neutralrotfärbung. Die Virusverdünnung, bei der etwa 100 Plaques pro Schälchen ausgezählt werden konnten, wurde 1 : 1 mit 1 : 4 vorverdünntem Serum gemischt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Je 2 Schälchen sekundärer FHE-Zellen wurden 1 Stunde bei 37°C mit diesen Mischungen inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS mit agarhaltigem Overlay beschichtet. Die Plaquereduktion wurde in Prozent ausgedrückt.

3.6. Serologische Verfahren

3.6.1. Indirekter Immunofluoreszenztest

Veränderte Zellkulturen in Schälchen wurden 3 Tage post infectionem

mit Aceton oder Methanol fixiert, mit verschiedenen bekannten Antiseren (ILT, Pacheco, Eulenherpes) beschichtet, 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert, mit PBS gewaschen, 30 Minuten mit Rabbit- anti - chicken- fluorescein-iso -thio - cyanat (Racfitc; Nordic) inkubiert und nach Waschen mit PBS mit Glyzerinpuffer eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mit einem Leitz-Ortholux Mikroskop mit Fluoreszenzausrüstung bei Dunkel - feld und im Durchlicht.
Okular 10, Objektiv 54
Erregerfilter BG 12 und BG 38
Sperrfilter 510
Quecksilberdampfdrucklampe HBO 200 (Osram)
fluoreszenzfreies Immersionsöl nD 1,515.

3.6.2. Neutralisationsteste

Es wurden Mikroneutralisationsteste in Form einer Serumverdünnungs-methode (log 10) mit konstanter Virusmenge (100 KID_{50}) sowie einer Virusverdünnungsmethode (log 10) mit konstanter Serummenge (1 : 4 verdünnt; inaktiviert) durchgeführt. Gleichzeitig wurden Zell-, Se - rum- und Viruskontrollen mitgeführt. Als bekannte Antiseren wurden verschiedene ILT-, Eulenherpes- und Pacheco-Seren sowie je ein Tau-benherpes-, Psittazidenpocken-, ND-, Adeno- und Reo-Antiseren ver-wendet.

3.7. Tierversuche

3.7.1. Amazonen

Fünf Grünwangenamazonen (amazona viridigenalis) aus Mexiko, die sich seit einem Jahr im Institut befinden, wurden mit Zellkul - turmaterial intranasal (0,2 ml) intraokkulär (0,2 ml) intratracheal (0,5 ml) sowie intramuskulär (0,5 ml) infiziert. Eine Amazone wurde als Kontakttier dazugesetzt. Am dritten und vierten Tag post in - fectionem wurde jeweils ein Tier getötet und histologisch Larynx, Trachea, Lunge, Leber, Milz und Nieren untersucht. Die Tiere wur - den zusammen in einer Isolatorabteilung gehalten und ad libidum ge-füttert.

3.7.2. Fasanen

Zwei weibliche und zwei männliche etwa 6 Monate alte Fasanen wurden

in gleicher Weise wie die Amazonen mit doppelter Virusmenge in - fiziert und 3, 4, 7 und 8 Tage post infectionem getötet und hi - stologisch die gleichen Organe wie im Amazonenversuch untersucht. Ein Fasanenhahn wurde als uninfiziertes Kontakttier weitere 14 Tage im Stall belassen.

3.7.3. Broiler

Ebenso wurden acht 16 Wochen alte Broiler infiziert und zusammen mit zwei Kontakttieren bei Bodenhaltung und ad libidum Fütterung eingestallt. Je zwei Tiere wurden 3, 4, 7 und 8 Tage post infectionem getötet und die Organe wie oben pathologisch und histologisch untersucht. Die Kontrolltiere wurden ebenfalls 14 Tage im Stall belassen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Virusanzüchtung über Eikulturen

4.1.1. Veränderungen nach CAM-Inokulation

17% der infizierten Hühnerembryonen starben 2 - 6 Tage post infectionem ab, sie waren haemorrhagisch und mazeriert. Die überlebenden, nach 6 Tagen untersuchten Embryonen zeigten unterschiedliche pathologisch-anatomische Veränderungen wie fettige Leberdegeneration und Haemorrhagien, Leber- und Leberrandnekrosen, Hepatitiden, teilweise mit gestauter Gallenblase, teilweise mit massiver galliger Imbibition. Bei einigen Tieren lagen starke Milzhyperplasien, Nephrosen und Nephritiden vor. Bei wenigen Embryonen konnten auch Haut- und Kopfblutungen festgestellt werden. Ein Embryo war verzwergt und ein weiterer hatte angewinkelte Gliedmaßen (Abb. 3).
Die CAM-Veränderungen bestanden in starker Gefäßzeichnung, kleinen, diffus verteilten, flachen Herden sowie kleinen punktförmigen und größeren erhabenen flächenhaften Proliferationen, die in einigen Fällen zentrale Nekrosen aufwiesen. Proliferative wie auch flache Herde traten vielfach entlang von Gefäßen auf. Daneben konnten auch sulzige Erhabenheiten, Verdichtungen, Trübungen, Uratablagerungen, Ödeme und Blutungen erkannt werden (Abb. 4). Mit zunehmender Passagezahl und zwar bereits ab der ersten Passage waren die Embryoveränderungen und, wenn auch in geringerem Maße, die CAM-Veränderungen weniger deutlich und umfangreich.

4.1.2. Veränderungen nach AH-Inokulation

Nach AH-Inokulation war die Überlebensrate der Embryonen wesentlich geringer; es waren nur 8,5 % mazerierte Embryonen zu beobachten. 33 % aller Embryonen waren ohne besonderen Befund. Die veränderten Embryonen, deren pathologische Läsionen mit steigender Passagezahl zunahmen, zeigten in der Ausgangspassage eine gallige Leberimbibition sowie eine geringe Milzhyperplasie, in folgenden Passagen geringe Ödeme, Haut- und Kopfblutungen, fettige Leberdegeneration und Hepatitis. Ein Embryo war verzwergt. Die CAM-Veränderungen bestanden aus wenigen Proliferationen und kleinen Herden, Uratablagerungen, Ödemen und Trübungen.

4.1.3. Veränderungen nach DO-Inokulation

Die höchste Embryoletalität war nach DO-Inokulation zu erkennen; sie lag bei 44 %; die abgestorbenen Embryonen waren mazeriert und stark blutig, einer auffallend blaß. Die pathologischen Veränderungen der übrigen Embryonen bestanden in fettigen Leberdegenerationen, Lebernekrosen, Hepatitiden, teilweise mit galliger Imbibition. Einmal waren sie mit Nephrose und Milzhyperplasie vergesellschaftet. Auf den Chorioallantoismembranen waren wenige kleine und teilweise größere Proliferationen an Gefäßen, Blutungen, Trübungen und Uratablagerungen zu sehen. In einigen Fällen fehlten jegliche Veränderungen. Die pathologischen Veränderungen nahmen mit steigender Passagenzahl ab.
Die bakteriologische Untersuchung, die bei allen abgestorbenen Hühnereiern durchgeführt wurde, war in jedem Fall negativ.

4.1.4. Infektionsablauf

Der Infektionsablauf wurde nach CAM-Inokulation verfolgt, da hierbei die deutlichsten Embryo- und CAM-Veränderungen auftraten.
Am zweiten Tag post inokulationem waren sowohl Embryonen als auch die CAM ohne besonderen Befund. Einen Tag später waren gallige Leberimbibitionen bei den Embryonen sowie geringe Proliferationen auf der CAM festzustellen.
Vier Tage post infectionem sah man Leberdegeneration und Leberblutungen der Embryonen und auf der CAM Trübungen und Proliferationen.
Deutlichere Veränderungen traten nach fünf Tagen auf und bestanden bei den Embryonen in Hepatitiden, Nephritiden und Milzhyperplasien, auf der CAM in reichlichen Proliferationen, teilweise mit zentraler Nekrose.
Erst 6 Tage post inokulationem konnten die typischen pathognomischen Veränderungen beobachtet werden. Es traten starke Hepatitiden und Leberrandnekrosen bei den Embryonen sowie massive Proliferationsherde und die unter 4.1.1. nach CAM-Inokulation beobachteten weiteren Veränderungen auf.

Tab. 1 Infektionsablauf

Tage post inokulationem	Embryopathien	CAM - Veränderungen
2	o.b.B.	o.b.B.
3	gallige Leberimbibition	geringe Proliferationsherde
4	Leberdegeneration Leberblutungen	Trübungen Proliferationsherde
5	leichte Hepatitis Nephritis, Milzhyperplasie	Proliferationsherde mit zentraler Nekrose
6	Hepatitis Leberrandnekrosen wie 4.1.1.	massive Proliferationen wie 4.1.1.

4.1.5. Virustitration

Die oben beschriebenen Embryopathien- und CAM-Veränderungen konnten bis zu einer Virusverdünnung von 10^{-2} festgestellt werden, wenn auch bei AH- und DO-Inokulation in wesentlich geringerer Ausprägung wie bei CAM-Inokulation. Bei einer Verdünnung von 10^{-3} waren nur noch etwa 50 % der Embryonen positiv; weitere Verdünnungsstufen erbrachten negative Ergebnisse. Nach REED und MUENCH betrug der proportionale Abstand 0,2. Der EID_{50} Endpunkt lag bei $10^{-3,2}$.

4.1.6. Hämagglutionationsverhalten

Die Objektträgerschnellagglutination der AAF von CAM-, AH- und DO-inokulierten SPF - Hühnereiern verlief sowohl mit einer 10%igen Hühnererythrozytensuspension als auch mit Erythrozyten von Enten, Gänsen und Tauben negativ. Dies konnte in allen Verdünnungsstufen und Passagen festgestellt werden. Eine Agglutination erbrachte das Kontrollvirus (Newcastle-Disease-Virus).

4.1.7. Präzipitationsverhalten

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C konnte nach CAM-Inokulation eine weiße Präzipitationsbande zwischen dem Virusisolat 1471/78

und verschiedenen ILT-Hyperimmunseren abgelesen werden. Diese trat in den Verdünnungsstufen 10^{0} bis 10^{-2} auf, in einigen Fällen jedoch erst ab der ersten Passage. Negativ verlief der Präzipitationstest weiterer Verdünnungsstufen sowie nach AH- und DO-Inokulation gegen die ILT-Hyperimmunseren.
Weitere getestete Seren erbrachten ebenfalls keine Präzipitation gegen unser Virusisolat.

Tab. 2 Präzipitationsverhalten

Hyperimmunseren	Virusisolat 1471/78
ILT	positiv
Newcastle -Disease	negativ
Adeno	negativ
Psittazidenpocken	negativ
Eulenherpes	negativ
Pacheco	negativ

4.1.8. Histologische Untersuchung von CAM-Läsionen

Auf der CAM infizierter SPF - Hühnereier waren zahlreiche loka - lisierte proliferative Herde von Epithelzellen und Fibroblasten sichtbar, in deren unmittelbarer Umgebung Hämorrhagien und Ödeme auftraten. Die Veränderungen waren auf bestimmte Areale beschränkt. Das Oberflächenepithel der proliferativen Herde wies nekrotische Veränderungen auf. Die zugrunde gegangenen Zellen waren teilweise abgeschilfert. Die großen blasigen Zellkerne der Epithelzellen zeigten eosinophile Kerneinschlußkörperchen vom Typ Cowdry A, umgeben von einem Halo. Einige perivaskuläre Infiltrate aus weni - gen Histiozyten waren vorhanden.

4.2. Virusanzüchtung in Zellkulturen

4.2.1. Veränderungen von Hühnerembryofibroblasten

Im Vergleich zu gleichzeitig angesetzten Zellkontrollen konnte man 48 - 72 Stunden nach Inokulation, teilweise auch bereits nach 24 Stunden, den Beginn eines deutlichen CPE erkennen. Er äußerte sich durch Abkugelung und Zusammenballung der spindelförmigen Fibroblastenzellen zu verschieden großen Herden. Diese hatten zum Teil Pseudomembranen und spindelförmige Fortsätze. In den Herden kam es zur Einlagerung von bräunlichem Pigment (Abb. 5 + 6). An einzelnen Stellen des Zellrasens konnte man eine Massierung erkennen. Nach weiteren 48 Stunden breiteten sich die anfangs herdförmigen Veränderungen über den ganzen Zellrasen aus und es kam zur Ablösung einzelner Zellen sowie ganzer pig - mentierter Herde, die dann frei im Medium schwammen. Der CPE schloß am Ende den ganzen Zellrasen ein. Bei Weiterpassagieren abgelöster Zellen und zellhaltigem Überstand konnten die be - schriebenen Veränderungen sowohl in FHE-Kulturen als auch im embryonierten SPF-Hühnereiern jedesmal erneut beobachtet werden.

4.2.2. Veränderungen von Moschusentenembryofibroblasten

Der CPE von FME - Kulturen trat frühestens 72 Stunden post in - okulationem auf und war weniger ausgeprägt wie bei FHE - Kultu - ren. Man konnte auch hier eine Abkugelung und Zusammenballung zu verschieden großen Herden erkennen, deren Pigmentierung rötlich-braun war. Die Zahl dieser Herde war jedoch wesentlich geringer und ging nach weiteren 3 - 4 Tagen in eine totale Lysis des Zell-rasens über.

4.2.3. Veränderungen von Hühnerembryonierenzellen

In diesem Zellsystem war der cytopathische Effekt am deutlichsten ausgeprägt. Er trat bereits 24 - 48 Stunden post inokulationem auf und entsprach im Aussehen dem CPE von FHE-Kulturen. Die Zahl der braun pigmentierten Proliferationsherde war jedoch größer. Eine vollständige Lysis des Zellrasens war 5 - 6 Tage post inokula - tionem zu erkennen.

4.2.4. Virustitration

Bei einer Titration des Virusisolates 1471/78 in log 10 Stufen

konnte der CPE auf FHE-Zellen bis zu einer Virusverdünnung von 10^{-2}, auf FME-Kulturen bis 10^{-3} ausgemacht werden. Bei der nächsten Verdünnungsstufe trat bei beiden Zellsystemen nur noch ein CPE bei etwa 40 % auf. Die KID_{50}, berechnet nach REED und MUENCH, betrug bei FHE-Kulturen $10^{-2,9}$, bei Hühnerembryonierenzellen $10^{-3,3}$.

4.2.5. Färbung auf Einschlußkörperchen

Nach HE-Färbung konnten in einer Vielzahl von Fibroblastenzellkernen bläulich-rötliche Einschlußkörperchen vom Typ Cowdry A festgestellt werden. Die Zahl der Einschlüsse pro Zellkern lag zwischen einem einzelnen und drei. Sie hatten zum Teil einen deutlichen Hof, das randständige Chromatin war verdickt (Abb. 7 und 8).

4.3. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Virus

4.3.1. Chloroformresistenztest

Nach Chloroformbehandlung verursachte das Virusisolat im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle keinen CPE auf FHE-Kulturen. Dies war in allen Verdünnungsstufen festzustellen.

4.3.2. Ätherresistenztest

Das Ergebnis dieses Testes entsprach dem des Chloroformresistenztestes.

4.3.3. Hitzeresistenztest

Bereits nach 15-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 56°C trat bei FHE-Zellen kein CPE mehr auf. Das gleiche Bild war nach 30- und 60-minütiger Hitzebehandlung festzustellen, es entsprach der Zellkontrolle.

4.3.4. Säureempfindlichkeitstest

Das Virusisolat war empfindlich gegenüber pH 3; bereits nach 30-minütiger Inkubation mit dem Mc Ilvaine-Puffer dieser pH-Stufe fehlte die Infektiosität. Keine Empfindlichkeit war gegenüber pH 6 und 8 festzustellen.

4.3.5. Nukleinsäurebestimmung

Nach Behandlung des Virusisolates mit JUDR konnten in FHE-Kulturen im Vergleich zu einem bekannten RNS-Virus und einer unbe-

handelten Viruskontrolle keine oder nur geringe Veränderungen festgestellt werden.

4.3.6. Größenbestimmung durch Filtration

Das Virusisolat passierte eine Filterschicht der Porengröße 0,45 und 0,22 µ , nicht jedoch bei 0,1 µ Porengröße.

Tab. 3 Physikalisch-chemische Eigenschaften des Virus

Testmethode		Infektiosität
Chloroform		negativ
Äther		negativ
Hitze	15 Min.	negativ
	30 Min.	negativ
	60 Min.	negativ
Säure	pH 3	negativ
	6	positiv
	8	positiv
JUDR		negativ bis schwach positiv
Filtration	0,1 µ	negativ
	0,22 µ	positiv
	0,45 µ	positiv

4.4.1. und 4.4.2. Plaque- und Plaquereduktionstest

Nach Färbung des über 5 Tage bei 37°C inkubierten Plaquetestes mit Neutralrot konnten keine Plaques festgestellt werden und dies in allen Verdünnungsstufen. Aus diesem Grunde erübrigte sich die Durchführung des Plaquereduktionstestes.

4.5. Serologische Verfahren

4.5.1. Indirekter Immunofluoreszenztest

Eine deutliche Fluoreszenz war nach Beschickung des mit dem Virusisolat 1471/78 infizierten Zellrasens mit verschiedenen ILT - Hyperimmunseren zu erkennen. Ein negatives Ergebnis war nach Verwen-

dung eines Pacheco- und Eulenherpesantiserums zu erkennen.

4.5.2. Neutralisationstest

4.5.2.1. Serumverdünnungsmethode

Das Virusisolat konnte weder durch verschiedene ILT-Hyperimmun - seren noch durch ein Eulenherpes-, Taubenherpes-, Pacheco-, Psittazidenpocken-, Newcastle-Disease-, Adeno- und Reo-Antiserum neu - tralisiert werden.

4.5.2.2. Virusverdünnungsmethode

Auch bei diesem Verfahren war keine Neutralisation zu erkennen.

Tab. 4a Neutralisationstest-Serumverdünnungsmethode

Hyperimmunserum	Virusisolat 1471/78
ILT 1	negativ
2	negativ
3	negativ
Eulenherpes	negativ
Taubenherpes	negativ
Pacheco	negativ
Psittazidenpocken	negativ
Newcastle-Disease	negativ
Adeno	negativ
Reo	negativ

Tab. 4b Neutralisationstest-Virusverdünnungsmethode

Hyperimmunserum	Virusisolat 1471/78
ILT 1	negativ
2	negativ
3	negativ

4.6. Tierversuche

4.6.1. Amazonen

Zwei Amazonen verendeten 3 Tage, eine weitere 4 Tage, die Kontaktamazone 6 Tage post infektionem. Der Serumantikörperspiegel der beiden am 3. und 4. Tag post infektionem getöteten Tiere war negativ. Die Tiere starben perakut, so daß es nicht zur Ausbildung klinischer Symptome kam. Der Ernährungszustand der Tiere war gut, einmal leicht reduziert.

Pathologisch-anatomisch traten eine beidseitige Luftsackentzündung, bei drei Tieren eine leichte Laryngitis, einmal mit vermehrter Schleimbildung, einmal eine Tracheitis, ein hochgradiges Lungenödem mit Blutungen, eine parenchymatöse Leberdegeneration, teilweise mit petechialen Blutungen sowie Milzhyperplasie, Nephrose mit Blutungen, Enteritis und Myodegeneratio cordis auf.

Bakteriologisch konnten in drei Fällen E. coli, in einem Streptokokken nachgewiesen werden.

Die histologische Untersuchung erbrachte folgende Befunde:

Im Larynx lag eine deutlich ausgeprägte lymphozytäre Entzündung der Mukosa mit Nekrosen des Oberflächenepithels vor. Im Bereich der Submukosa bestand eine ausgeprägte Hyperämie und ein Ödem. Im Bereich der Schleimdrüsen waren die Epithelzellen gewuchert und stark vergrößert. Sie befanden sich im Zustand einer schleimigen Degeneration mit Kernschwund. In Umgebung von Nekroseherden waren vereinzelt Kerneinschlüsse in Epithelzellen feststellbar. Generell waren die Zellkerne der noch vorhandenen Epithelzellen groß und chromatinarm, teilweise im Zustand der Lysis. Die Zellgrenzen waren oft nicht mehr nachweisbar.

Das Oberflächenepithel der Trachea fehlte teilweise vollständig. Unter dem sehr schwachen einschichtigen Schleimhautepithel war in der Submukosa ein starkes Ödem mit entzündlichen Infiltrationen und Hämorrhagien sichtbar. Die Schleimdrüsen zeigten, soweit vorhanden, eine schleimige Epithelzelldegeneration. Die Mukosa war zum Teil völlig verloren gegangen.

In der Lunge bestand eine interstitielle Pneumonie mit ausgeprägter Ödematon und emphysematösen Herden. Arterien und Venen waren stark blutgefüllt, die Kapillarwände verquollen. Gefäßwand -

rupturen führten zum Austritt von Plasma und Erythrozyten. In der Mukosa der großen Bronchien lag eine Epithelzellhyperplasie mit Beteiligung von wenig Entzündungszellen vor. Das Bronchialepithel war nekrotisch und löste sich teilweise in großen Mengen in das Lumen hin ab.
Die Leberveränderungen bestanden in degenerativen Leberzellver - änderungen bis zu einzelnen Leberzellnekrosen. Die Gefäßwände waren ödematös und gequollen, Austritt von Plasma und Erythrozyten in die Gefäßumgebung wurde beobachtet. Das Gefäßendothel war aufgelockert. Die rote Milzpulpa war vermehrt blutgefüllt, zahlreiche Nekroseherde waren in den Germinalzentren sichtbar. Sie waren zum Teil von Lymphozyten entspeichert. Die Retikulumzellen der Germinalzentren waren hyp rplastisch und zeigten selten Kerneinschlüsse.
Weniger ausgeprägt waren die Nierenveränderungen. Es bestand gele - gentlich eine Hyperämie und selten eine geringgradige Glomerulitis. Die gleichsinnigen histologischen Veränderungen waren bei Kontakt - tieren wie auch bei Fasanen und Broilerküken deutlicher ausgeprägt. Eine Virusrückisolierung aus Organ- und Trachealmaterial via Ei - kultur gelang bei 2 Amazonen bereits in der Ausgangspassage, bei den weiteren Tieren in der ersten Passage. Embryopathien und CAM - Veränderungen entsprachen denen unter 4.1. beschriebenen Veränderungen

4.6.2. Fasanen

Obwohl die infizierten Fasanen keine klinischen Symptome zeigten, die Letalität bei 0 % lag, Serumantikörper in keinem Fall nachge - wiesen werden konnten und der Ernährungszustand der Tiere gut bis sehr gut war, waren doch pathologisch-anatomisch bei den am 3., 4., 7. und 8. Tag getöteten Fasanen Laryngitis, Entzündung der Conchien, Luftsacktrübung, Lungenödem, eine leichte Hepatitis mit vermehrter Gefäßinjektion der Leber sowie eine Milzhyperplasie, bei der zum Teil die weiße Pulpa vermehrt sichtbar war, zu erkennen. Der 14 Tage post infectionem getötete Kontaktfasan zeigte Laryngitis, Entzündung der Conchien, Tracheitis sowie Hepatitis.
Bakteriologisch waren keine Keime im Direktausstrich nachweisbar. Bei der histologischen Untersuchung waren im Larynx Nekrosen des Oberflächen- und Schleimdrüsenepithels, in der Submukosa eine aus -

geprägte Hyperämie und Ödeme zu erkennen. Herdförmig traten teil - weise perivaskuläre entzündliche Infiltrate aus Lymphozyten, Histio - zyten und wenigen Plasmazellen auf. In den verblassenden Zellkernen des Oberflächenepithels waren vereinzelt eosinophile Kerneinschlüsse sichtbar. In der Submukosa waren im aufgelockerten Gewebe entzünd - liche perivaskuläre Herde zu erkennen.
In der Trachea herrschten Epithelzellnekrosen und Hyperämie und Ödeme in der Submukosa vor; das Oberflächenepithel war, wie auch das Epi - thel der zugrunde gegangenen schleimig degenerierten Drüsenzellen teilweise abgelöst. Eosinophile Kerneinschlüsse waren selten nach - weisbar. Die Mukosa war über große Strecken von der Unterlage völlig abgelöst. Wenige Lymphozyten und Histiozyten durchsetzten Mukosa und Submukosa.
In der Lunge lagen eine lymphozytäre Bronchopneumonie und Nekrosen des Bronchialepithels vor. Ansammlungen von Detritus und eiweiß - reicher Flüssigkeit führten zum Verschluß von Bronchien und Bron - chioli. Es bestanden peribronchiale Entzündungsherde, Ödeme und Emphyseme.
Die Milzveränderungen bestanden in Zubildung von Germinalzentren, in denen Retikulumzellen mit großen blassen Kernen und Kerneinschluß - körperchen sichtbar waren. Die rote Milzpulpa war blutarm. In der Subserosa war eine Verdickung des Bindegewebes zu erkennen.
In der Leber waren eine schaumige Degeneration der Leberzellen, klei - ne Zellysisherde sowie eine Verquellung der Kapillarwände mit Extra - vasatbildung und Ödemen zu erkennen.
Die Virusrückisolierung war in einem Fall in der Ausgangspassage möglich, bei einem Tier in der ersten Passage. Bei zwei Fasanen war sie trotz bestehender pathologisch-anatomischer Veränderungen nicht erfolgreich.

4.6.3. Broilerküken

Die infizierten Broilerküken zeigten klinisch ein leichtes Röcheln, es starb jedoch kein Tier vor der Tötung. Auch hier waren in keinem Fall Serumantikörper nachweisbar. Der Ernährungszustand der Tiere war gut.
Pathologisch-anatomisch zeigten zwei Broilerküken keine besonderen Veränderungen. Viermal waren Laryngitis mit vermehrter Schleimbil - dung, zweimal Tracheitis und Lungenödem, dreimal Luftsacktrübung zu erkennen. Des weiteren traten bei einigen Tieren Hyperämie der

Cäcaltonsillen, lobuläre Pneumonie mit Stauung der großen Blutgefäße sowie Nierenschwellung auf.
Ein Kontaktbroiler starb 14 Tage nach dem Kontakt mit infizierten Tieren, zwei weitere wurden zu diesem Zeitpunkt getötet. Die Tiere zeigten Laryngitis, vermehrte Schleimbildung in Conchien und Schnabelhöhle, Hepatitis mit Nekrosen sowie Nephritis. Serumantikörper waren nicht nachweisbar.
Bakteriologisch waren eine Mischkultur von Staphylokokken, Streptokokken, E. coli und verschiedenen Enterobacteriaceae nachweisbar.
Histologisch konnten im Larynx eine Epithelzellhyperplasie mit teilweiser Ablösung des Oberflächenepithels, eine schleimige Degeneration des Drüsenepithels sowie eine zellige Infiltration mit Lymphozyten und Histiozyten in Mukosa und Submukosa erkannt werden.
In der Trachea lag eine Abschilferung des Oberflächenepithels vor, das zum Teil völlig fehlte. Es bestand eine Hyperämie der Submukosa sowie eine diffuse entzündliche Infiltration derselben.
In der Lunge wurden eine chronische Bronchitis mit massiver Bindegewebszubildung sowie Emphyseme, Ödeme und Hämorrhagien beobachtet. Um die peribronchialen Gefäße war es zu einer deutlichen Bindegewebszubildung mit Infiltration von Plasmazellen und Histiozyten gekommen.
Die Milzveränderungen bestanden in Vermehrung der Germinalzentren, deren Retikulumzellen gewuchert erschienen, während Lymphozyten fehlten. Die rote Pulpa war verbreitert. Die Wände der Arterien waren durch Bindegewebszubildung ungewöhnlich breit.
Die Leber war ödematös, schaumig degeneriert sowie herdförmig zellig infiltriert. Die entzündlichen Herde waren vorwiegend aus Histiozyten und Lymphozyten zusammengesetzt. Die Leberzellen waren groß und gebläht.
Die Virusrückisolierung über Eikultur war in drei Fällen trotz Vorliegen von pathologisch-anatomischen und histologischen Veränderungen negativ, in zwei Fällen gelang sie in der Ausgangspassage. Die übrigen Organ- und Trachealproben waren erst in der ersten und zweiten Passage positiv.

5. DISKUSSION

Die Zugehörigkeit des untersuchten Virusisolates 1471/78 aus Organmaterial einer Blaustirnamazone zur Familie der Herpesviren konnte durch Ei- und Zellkulturmethoden, serologische und physikalisch-chemische Verfahren sowie im Tierversuch eindeutig bestätigt werden.

Die Virusanzüchtung über Eikultur erbrachte die deutlichsten Ergebnisse nach CAM - Inokulation, die als Mittel der Wahl zur Isolierung von Herpesviren (Eulen-, Tauben-, Falken- und Psittazidenherpesviren) angesehen werden kann. Nach AH- und DO-Inokulation können zwar ebenfalls Embryopathien und CAM-Veränderungen festgestellt werden, die jedoch wesentlich geringer ausgeprägt sind als nach CAM-Inokulation.

Bei den infizierten Embryonen können pathologisch-anatomische Veränderungen wie fettige Leberdegeneration und Leberblutungen, Leber- und Leberrandnekrosen, Hepatitiden, teilweise mit gestauter Gallenblase und massiver galliger Imbibition gesehen werden. Vereinzelt liegen Milzhyperplasien, Nephrosen und Nephritiden sowie Embryolethalität (besonders nach DO-Inokulation) und Mißbildungen vor. Die CAM-Veränderungen bestehen vor allem in starker Gefäßzeichnung sowie kleinen flachen und proliferativen Herden mit einzelnen zentralen Nekrosen. Diese Herde treten vor allem in Gefäßnähe auf. In ihnen können eosinophile Kerneinschlußkörperchen nachgewiesen werden. Auch Ödeme, Blutungen, Trübungen und Uratablagerungen sind feststellbar. Die Intensität der Eikulturveränderungen nimmt mit steigender Passagenzahl nicht zu, sondern wird geringer. Das Virus scheint mit zunehmender Passagenzahl abgeschwächt zu werden. Die deutlichsten Veränderungen werden sechs Tage post infectionem erkannt. Der Virustiter liegt sehr nieder, die EID_{50} betrug $10^{-3,2}$.

Durch das Hämagglutinationsverhalten mit verschiedenen Erythrozyten kann die Zugehörigkeit zur Familie der Ortho- und Paramyxoviren ausgeschlossen werden.

Der CPE, der vor allem in Hühnerembryofibroblasten- und Hühnerembryonierenzellkulturen deutlich ausgeprägt ist, äußert sich vor allem in Abkugelung und herdförmiger Zusammenballung der infizierten Fibroblasten, in Einlagerung von bräunlichem Pigment in den proliferativen Herden, Verteilung der anfangs lokalisiert auftreten-

den Herde über den ganzen Zellrasen sowie in einer Ablösung der gesamten Zellkultur. In einer Vielzahl von Zellkernen treten eosinophile Einschlußkörperchen vom Typ Cowdry A auf. Die KID_{50} nach Virusvermehrung in Hühnerembryofibroblastenkulturen liegt bei $10^{-2,9}$, in Hühnerembryonierenzellkulturen bei $10^{-3,3}$.

Bei physikalisch-chemischen Untersuchungen erweist sich das Virusisolat als chloroform-, äther-, hitze- (15 Min., 56°C) und säureempfindlich (pH 3). Das Viruswachstum wird durch JUDR stark gehemmt, zum Teil völlig aufgehoben. Durch Filtration wird die Partikelgröße des Virusisolates zwischen 0,1 und 0,22 µ eingegrenzt.

Durch die aufgeführten Ergebnisse kann eine Zugehörigkeit des untersuchten Virusisolates zur Familie der Herpesviren eindeutig bestätigt werden. Die Ergebnisse weisen große Ähnlichkeiten zu bereits vorhandenen Veröffentlichungen und Untersuchungen mit Psittaziden-, Eulen-, Tauben- und Falkenherpesviren auf (BURTSCHER u. Mit. 66, 75; SCHETTLER 69, 70; WARD u. Mit. 71; BÜRKI u. Mit. 73; BOYLE u. Mit. 73; MARÉ u. Mit. 75; SIMPSON u. Mit. 75, 76; SIEGMANN 76; MAYR, BACHMANN u. Mit. 77; WINTEROLL 77, 79; VINDEVOGEL u. Mit. 77; HELMBOLDT u. Mit. 77; COOPER u. Mit. 77; ROLLE u. MAYR 78; HANSON 78; HITCHNER u. Mit. 78; HIRAI u. Mit. 78; RANDALL u. Mit. 79; MILLER u. Mit. 79; MARTIN u. Mit. 79 sowie KALETA u. Mit. 80).

Widersprüchlich zur vorhandenen Literatur ist das Ergebnis des Plaquetestes. Bei dem untersuchten Virusisolat können nach Neutralrotfärbung keine Plaques in infizierten Zellkulturen festgestellt werden. Es wäre möglich, daß durch den relativ niedrigen Virustiter die Ausbildung der Plaques unter dem Overlay-Medium nicht stattfinden kann.

Die Veränderungen,die durch ILT-Viren in Ei- und Zellkulturen verursacht werden, sind nicht eindeutig von denen durch andere Herpesviren verursachten abzugrenzen. Daher kann durch die erwähnten Ergebnisse noch keine genaue Beziehung des Virusisolates zum ILT - Virus getroffen werden. Durch das Ergebnis des Agargelpräzipitationstestes und des indirekten Immunofluoreszenztestes kann jedoch eine gruppenspezifische serologische Verwandschaft zwischen beiden festgestellt werden. Das Virusisolat zeigt eine deutliche Präzipitationsreaktion mit dem ILT - Serum, nicht jedoch mit weiteren Herpesviren. Diese ist nur nach CAM - Vermehrung des Isolates feststellbar. Ebenso kann eine Fluoreszenzreaktion nur mit dem ILT-Virus, nicht jedoch mit wei-

teren Herpesvirusgruppen abgelesen werden. Eine typspezifische Beziehung kann jedoch durch das negative Ergebnis des Neutralisationstestes ausgeschlossen werden.
Eine deutliche Bestätigung der Verwandtschaft mit dem ILT-Virus erbrachten auch die Ergebnisse der Tierversuche.
Klinisch zeigt sich eine perakute Verlaufsform bei Grünwangenamazonen. Eine chronische bis klinisch inapparente Verlaufsform kann bei adulten Fasanen und Broilerküken festgestellt werden.
Wie bei HANSON 78; ROLLE, MAYR 78 und GRATZL u. KÖHLER 68 beschrieben, sind pathologisch - anatomische Veränderungen vor allem im Respirationstrakt feststellbar, weniger in Milz, Leber und Niere. So treten Laryngitis, Tracheitis, Pneumonie, Lungenoedeme und -blutungen, Luftsacktrübung sowie Hepatitis, Leberdegeneration, Milzhyperplasien und Nephrosen auf.
Auch die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen entsprechen den von HORZINEK 78; HANSON 78; ROLLE, MAYR 78 und GRATZL u. KÖHLER 68 bei ILT - Virusinfektionen festgestellten.
So treten im Larynx unter anderem Zerstörung des Oberflächen- und Schleimhautepithels, entzündliche Infiltrate (Histiozyten, Plasmazellen, Lymphozyten und wenige Eosinophile), eosinophile Kerneinschlußkörperchen, Degeneration des Drüsenepithels und Zerstörung von Mukosa und Submukosa auf. In der Trachea werden festgestellt Ödeme, Hyperämie, Fehlen des Oberflächenepithels, entzündliche Infiltrate wie im Larynx sowie Schleimdrüsendegeneration. Eine Bronchopneumonie mit Ödemen, Hyperämie und Emphysem werden in der Lunge gesehen.
Das Auftreten von eosinophilen Kerneinschlüssen vom Typ Cowdry A kann nur vereinzelt festgestellt werden.
Die Veränderungen von Kontakttieren sind ausgeprägter, hier können jedoch in keinem Fall Kerneinschlüsse nachgewiesen werden.
Die Virusrückisolierung über Eikultur ist in den meisten Fällen möglich, jedoch nach unterschiedlicher Passagezahl.
Das vollständige Wirtsspektrum ist jedoch nicht abgeklärt; die Durchführung weiterer Tierversuche wird noch notwendig sein.
Aufgrund der Ergebnisse von Ei- und Zellkulturmethoden, serologischer und physikalisch-chemischer Untersuchungen sowie der Tierversuche kann das untersuchte Virusisolat eindeutig als Herpesvirus bezeichnet werden, das eine gruppenspezifische, jedoch nicht typspezifische Verwandtschaft zum Virus der Infektiösen Laryngotracheitis aufweist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde ein mit dem ILT - Virus serologisch verwandtes Herpesvirusisolat (1471/78) aus Organmaterial einer Blaustirnamazone mittels Eikultur- und Zellkulturmethoden, serologischer und physikalisch-chemischer Untersuchungen, sowie im Tierversuch näher charakterisiert.
Das Virusisolat weist bei Anzüchtung in SPF - Hühnereiern typische Herpesviruseigenschaften auf. Das Hämagglutinationsverhalten gegenüber verschiedenen Vogelerythrozyten ist negativ. Charakteristisch für dieses Virus ist eine bräunliche Pigmentierung der in Hühnerembryofibroblasten-, Hühnerembryonieren- und Moschusentenembryofibroblastenkulturen auftretenden Proliferationsherde. In diesen sind regelmäßig, vor allem in ersteren, Kerneinschlußkörperchen vom Typ Cowdry A nachweisbar.
Bei serologischen Untersuchungen können Antigengemeinschaften mit dem ILT - Virus im Agargelpräzipitationstest und im indirekten Immunofluoreszenztest, nicht jedoch im Neutralisationstest festgestellt werden. Zum Eulenherpes-, Taubenherpes-, Pacheco-, Newcastle Disease-, Adeno- und Reo - Virus besteht keine serologische Beziehung.
Im Tierversuch erweisen sich Grünwangenamazonen, Fasanen und Broilerküken empfänglich für das Virusisolat. Der Krankheitsverlauf ist bei Amazonen perakut, bei den anderen Tieren subakut bis chronisch. Die erzeugten pathologisch-anatomischen und histologischen Läsionen zeigen bezüglich Lokalisation und Ausprägung große Ähnlichkeiten mit den bekannten durch ILT verursachten Veränderungen. Das vollständige Wirtsspektrum des Virusisolates ist noch nicht geklärt.
Das untersuchte Herpesvirusisolat kann als gruppenspezifisch, jedoch nicht typspezifisch verwandt mit dem ILT - Virus eingeordnet werden.

SUMMARY

In this work a herpesvirus isolate (1471/78) from organs of a blue-fronted amazone with serological relationship to the ILT - virus has been more closely characterized by means of egg- and tissue-culture, serological and physical-chemical reactios as well as by its behavior in experimentally infected birds.
In SPF - embryonated chicken eggs the virusisolate shows typical characteristics of herpesviruses. The hemagglutination reaction with several erythrocytes of birds is negative. Characteristic for this virus is a brown pigmentation of proliferations in embryofibroblast-, embryokidney- and muscovy-duck-fibroblast cultures. Specially in the first two cases,the existance of inclusion bodies from type Cowdry A can be proven on a regular basis.
By two of three serological tests, in particular the precipitation and indirect immunofluorescence tests, the antigenetic relationship between the isolate and the ILT - virus was clearly demonstrated. Only the neutralisationtest failed. No serological relationship could be seen with the herpesviruses of owls, pigeons, with the Pacheco virus, the psittacine pox virus, the Adeno- and the Reo-virus.
In tests of experimentally infected birds, green-cheeked amazones, pheasants and broilers showed susceptibility to the herpesvirus isolate. The progress of the infection was peracute in amazones, subacute to chronic in other birds. The resulting pathologic-anatomical and histological lesions are quite similar to the typical ILT - caused changes with respect to localisation and extend. The complete host spectrum is not yet known.
The tested herpesvirus isolate can be classified as group-specific, but not as type-specific in comparison to the ILT - virus.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

BOYLE, D.B. and BINNINGTON, J.A. (1973)
Isolation of a Herpesvirus from a pigeon
Australian Veterinary Journal 49, 54

BÜRKI, F. and BURTSCHER, H. and SIBALIN, M. (1973)
Herpesvirus Strigis: A New Avian Herpesvirus
I. Biological Properties
Arch. f. d. ges. Virusforschung 43, 14 - 24

BURTSCHER, H. (1965)
Die virusbedingte Hepatosplenitis infectiosa strigorum
1. Mitteilung: Morphologische Untersuchungen
Path. vet. 2, 227 - 255

BURTSCHER, H. und GRÜNBERG, W. (1979)
Herpesvirus-Hepatitis bei Kranichen (Aves: Gruidae)
I. Pathomorphologische Befunde
Zbl. Vet. Med. B 26, 561 - 569

BURTSCHER, H. und SIBALIN, M. (1975)
Herpesvirus strigis: Host spectrum and distribution in infected owls
J. Wildl. Dis. 11, 164 - 169

BURTSCHER, H. und SCHUMACHER, A. (1966)
Morphologische Untersuchungen zur Virusätiologie der Hepatosplenitis infectiosa strigum
Path. vet. 3, 506 - 528

COOPER, R. and HOWARD, E. (1977)
Inclusion Body Disease of Psittacines
Proceedings 26 th Poultry Disease Conference and 11 th Poultry Health Symposium Davis, California
24 - 28

CORNWELL, H.J.C. and WEIR, A.R. (1970)
Herpesvirus infection of pigeons.
Growth of the virus in tissue culture and comparison of its cytopathogenity with that of the virus of laryngo-tracheitis and pi - geon-pox.
J. Comp. Path. 80, 517 - 523

CORNWELL, H.J.C. and WEIR, A.R. - FOLLET, E.A.C. (1967)
A herpesvirus infection of pigeons
Vet. Rec. 81, 267

CORNWELL, H.J.C. and WRIGHT, N.G. (1970)
Herpesvirus infection of pigeons
Pathologie and virus isolation
Comp. Path. 80, 221 - 227

EHRSAM, H., HAUSER, B. and METZLER, A. (1978)
Pachecos Papageienkrankheit - akuter Ausbruch in einem einheimischen Psittazidenbestand
Schweiz. Arch. Tierheilk. 120, 23 - 28

FINDLAY, G. M. (1933)
Pacheco's Parrot Disease
Vet. J. 89, 12

FRENCH, E.L., PURCHASE, H.G. and NAZERIAN, K. (1973)
A New Herpesvirus isolated from a Nestling Cormorant (Phalacrocorax Melanoleucos)
Avian Pathologie Vol. 2, No. 1, 3 - 15

GRAHAM, D.L. (1973)
Studies on Inclusion Body Disease (Herpes - virus Infection) of Falcons
PHD - Thesis
Iowa State University Library Ames, Iowa

GRAHAM, D.L., MARÉ, C.J. and WARD, F.P. and PECKHAN, M.C. (1974)
Inclusion Body Disease
(Herpesvirus Infection) of Falcons (IBDF)
J. Wildlif. Dis. 11: 83 - 91

GRATZL, E. and KÖHLER, H. (1968)
Spezielle Pathologie und Therapie der Ge - flügelkrankheiten
Ferd. Enke Verlag Stuttgart

HELFER, D.H., SCHMITZ, J.A., SEEFELDT, S.C. and LOWENSTINE, L. (1980)
A New Viral Respiratory Infection in Parakeets
Avian Dis. Vol. 24, No. 3, 781 - 783

HELMBOLDT, C.F., HELFER, D.H., COLES, B. (1977)
A Viral Hepatitis in Psittacines
Proceedings of 26 th Western Poultry Di - sease Conference and 11 th Poultry Health Symposium 139

HIRAI, K., HITCHNER, S.B. and CALNEK, B.W. (1979)
Characterization of paramyxo -,herpes- and orbivirus isolated from psittacine birds
Avian Dis. 23, 148 - 163

HITCHNER, S.B. and HIRAI, K. (1979)
Isolation and growth characteristics of psittacine viruses in chicken embryos
Avian Dis. 23, 139 - 147

HORZINEK, M. (1975) Kompendium der allgemeinen Virologie
Paul Parey Verlag

HOFSTAD, M.S., CALNEK, B.W., HELMBOLDT, C.F., REID, C.F., YODER, J.R.
Diseases of Poultry (1978)
S. 505 - 512, Chapter 17 - Laryngotracheitis
L.E. Hanson

JENTSCH, K.D. (1967) Immunofluoreszenz in der medizinischen Mikrobiologie
Verlag J.A. Barth, Leipzig

JORDAN, F.F.W. (1963) A Review of The Literature on Infectious Laryngotracheitis (ILT)
Avian Disease 1 - 23

KALETA, E.F., MARSCHALL, H.J., HEFFELS, U., MIKAMI, T. (1980)
Nachweis eines Herpesvirus bei Amazonen (Amazone aestiva u. A. ochrocephala)
Zbl. Vet. Med. B 27, 405 - 411

KALETA, E.F., MIKAMI , T., MARSCHALL, H.J., HEFFELS, U., HEIDENREICH, M., STRIBUREK, B.
A new herpes virus isolated from black starks (Ciconia nigra)
Avian Pathol. 9, 301 - 310

KALINER, G. (1975)
Intranuclear Hepatitic Inclusion Bodies in an African Grey Parrot
Avian Dis. vol. 19, No. 3, 640 - 642

KOCAN, R. M. (1976)
Duck Plaque Virus Replication in Muscovy Duck Fibroblast Celles
Avian Dis. vol. 20, No. 3, 574 - 580

MARÉ, C. J. Herpesviruses of birds of Prey (1975)
J. Zoo. An. Med. 6 : 6 - 11

MARÉ, C.J., GRAHAM (1973)
Falcon herpesvirus, the etiologic agent of inclusion body disease of falcons
Infect. Immun. 8 - 118

MARÉ, C. J., GRAHAM (1975)
Pathogenity and Host Range of the falcon Herpesvirus
Kongreß Wildlife Disease München

MARTIN, H.T., EARLY, J.L., BRIDGER, J. C.
(1979)
The isolation of herpesvirus from psittacine birds
Vet. Rec. 105, 256 - 258

MARTIN, W.B. (1976)
The herpesviruses
Vet. Rec 99, 352 - 354

MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B. u. WITTMANN, G.
(1977)
Virologische Arbeitsmethoden
Band I u. II
Gustav Fischer Verlag Jena

MILLER, T.D., MILLAR, D.L., NAQUI, S.A.
(1979)
Isolation of Pacheco's disease herpesvirus in Texas
Avian Dis. 23, 753 - 756

PACHECO, G. (1931) Nouvelles recherches sur la psittacose des perroquets
C.R. Soc. Biol. (Paris) 106, 372 - 374

PACHECO, G. u. BIER, O. (1930)
Epizootie chez les perroquets du Brésil
Relations avec la psittacose
C.R. Soc. Biol. (Paris) 105, 109 - 111

POTGIETER, L.N.D., KOCAN, A.A., KOCAN, K.M.
(1979)
Isolation of A Herpesvirus From An Kestrel With Inclusion Body Disease
J. Wildl. Dis. 15, 143 - 149

RANDALL, C.J., DAGLES , M.D., JONES, H.G.R., MAC DONALD, J.W. (1979)
Herpesvirus Infection Resembling Pacheco's Disease in Amazon Parrots
Avian Path. 8, 229 - 238

RIVERS, T.M. (1931)
A recently described disease of parrots and parrakeets differing from psitta - cosis
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 29, 155 - 156

RIVERS, T.M., SCHWENTKER, F.F. (1932)
A virus disease of parrots and parrakeets differing from psittacosis
I. Exp. Med. 55, 911 - 924

ROLLE, M. u. MAYR, A. (1978)
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchen - lehre
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

RUDOLPH, R., KÖSTERS, J.(1979)
Virushepatitis bei Graupapagei und Alexandersittich
28. Tagung der Europ. Gesellschaft für Vet. Pathol. Stuttgart

SCHETTLER, C.H. (1969)
Eine infektiöse Leberentzündung (Hepatitis) der Eulen
Tierärztl. Umschau 24, 163 - 167

SCHETTLER, C.H. (1970)
In vitro Untersuchungen über die Eigen - schaften des Virus der Hepatitis et Splenitis Infectiosa Strigum

SCHETTLER, C.H.
Erkrankungen der Zootiere, 205 - 209
(Verhandlungsbericht des XII. Int. Symposium über die Erkrankungen der Zootiere Budapest 1970)
Akademie-Verlag Berlin

SIEGMANN, O.
(1976)
Kompendium der Geflügelkrankheiten
Verlag M. und H. Schaper, Hannover

SIMPSON, C.F., HANLEY, J.E.
(1976)
Pacheco's Parrot Disease of Psittacine Birds
Avian Dis. 21, 209 - 219

SIMPSON, C.F., HANLEY, J.E., GASKIN, J.M.
(1975)
Psittacine Herpesvirus Infection Resembling Pacheco's Parrot Disease
J. of Inf. Dis. Vol. 131, No.4, 390 - 396

SNOEYENBOS, G.H., BASCH, H.J., SEVOIAN,M.
(1959)
An Infectious Agent Producing Hepatitis in Turkeys
Avian Dis. 3, 377 - 387

SMADEL, J.E., JACKSON, E.B., HARMAN, J.W.
(1945)
A New Virus Disease of Pigeons
I.Recovery of the Virus
J. exp. Med. 81, 385 - 398

TZIANABOS, T., SNOEYENBOS, G.H.
(1964)
Some physicochemical Properties of Turkey Hepatitis Virus
Avian Dis. 9, 152 - 156

VINDEVOGEL, H., DUCHATEL, J.P., BURTONBOY, G.
(1978)
Infection herpétique de psittacidés
Ann. Med. Vet. 122, 167 - 169

VINDEVOGEL, H., DUCHATEL, H.P., GOUFFAUX, M.
(1977)
Pigeon Herpes Virus
I. Pathogenesis of Pigeon Herpesvirus
in chicken Embryo Fibroblasts
J. Comp. Path 87, 597 - 603

VINDEVOGEL, H., DUCHATEL, H.P., GOUFFAUX, M.,PASTORET, P.P.
(1977)
Pigeon Herpes Virus
II. Susceptibility of Avian and Mammalian
Cell Cultures to Infection with Pigeon
Herpes Virus
J. Comp. Path. 87, 605 - 610

VINDEVOGEL, H., PASTORET, P.P., LEROY, P. u. COIGNOUL, F.
(1980)
Comparaison De Trois Souches De Virus
Herpetique Isolees De Psittacides Avec
Le Virus Herpes Du Pigeon
Avian Pathologie 9, 385 - 394

WARD, F.P., FAIRCHILD, D.G., VUICICH, J.V.
(1971)
Inclusion Body Hepatitis in A Prairie
Falcon
J. Wildl. Dis. 7, 120 - 124

WINTERFIELD, R.W., SO, J.G. (1907)
Susceptibility of Turkeys To Infectious
Laryngotracheitis
Avian Dis. 9, 191 - 2o2

WINTEROLL, G. (1977)
Herpesvirusinfektionen bei Psittaciden
Der prakt. Tierarzt 5, 321 - 322

WINTEROLL, G., GYLSTORFF, I.
(1979)
Schwere durch Herpesvirus verursachte Erkrankung des Respirationsapparates bei Amazonen
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 277 - 28

YAMADA, S., MATSUO, K., FUKUDA, T., UCHINUNO, Y.
(1980)
Susceptibility of Ducks to the Virus of In fections Laryngotracheitis
Avian Dis. Vol. 24, No. 4, 930 - 938.

8. ABBILDUNGEN

Abb. 1 Hämorrhagische Tracheitis

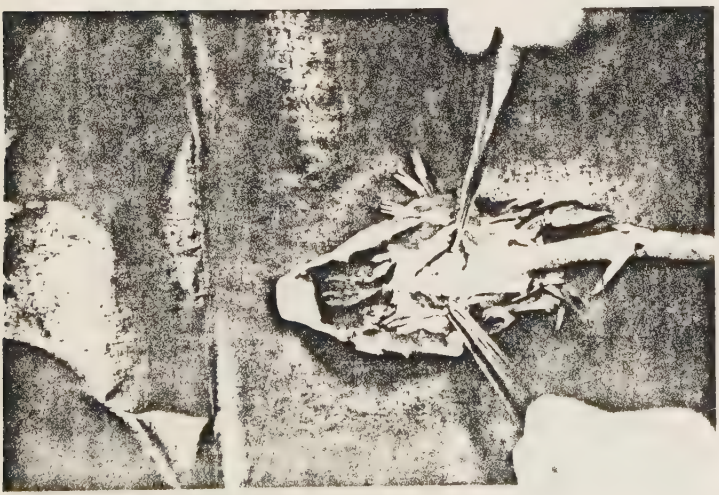

Abb. 2 Fibrinauflagerungen im Larynx

Abb. 3 Leberrandnekrosen eines Hühnerembryos

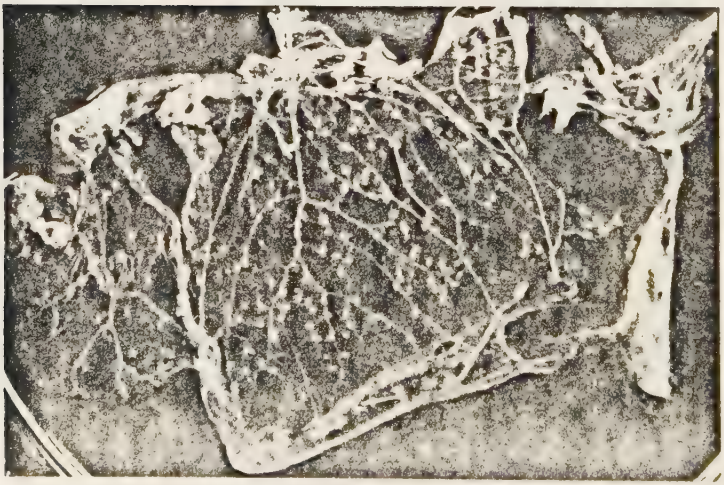

Abb. 4 Flache und proliferative Veränderungen auf der CAM

Abb. 5 Braun pigmentierter Herd in Hühnerembryofibroblasten

Abb. 6 Braun pigmentierter Herd in Hühnerembryofibroblasten

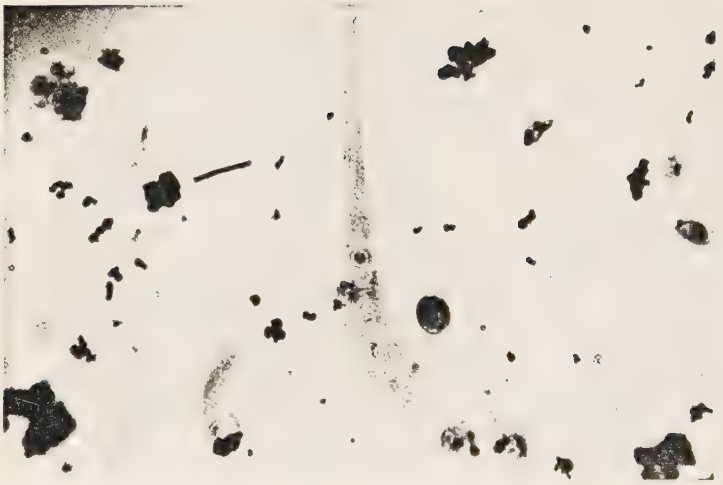

Abb. 7 Eosinophile Kerneinschlußkörperchen vom Typ Cowdry A in infizierten Hühnerembryofibroblasten

Abb. 8 Eosinophile Kerneinschlußkörperchen vom Typ Cowdry A in infizierten Hühnerembryofibroblasten

Frau Prof. Dr. GYLSTORFF danke ich für die Überlassung des Themas und die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Weiterer Dank gebührt Frau Dr. Dr. habil. H. GERLACH für die durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen.

Frau D. KYKILLUS und Frau Th. HUBER danke ich für die geleistete Hilfe und Unterstützung im Viruslabor.

Für die Hilfeleistung bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und photographischen Arbeiten danke ich Frau L. REIMANN, Frl. U. KNOPS und Frl. B. PITTRICH.

Lebenslauf

Am 21. 7. 1953 wurde ich, Dagmar Kitzing, als Tochter des Bilanzbuchhalters Hans Joachim Kitzing und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Schwaier, in München geboren.

Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Volksschule St. Martin in München, anschließend das Theodolinden - Realgymnasium, dessen Besuch ich 1972 mit dem Abitur abschloß.

In den Jahren 1972 und 1973 studierte ich zwei Semester Mathematik und Physik an der Ludwigs- Maximilians- Universität München.

Mit dem Wintersemester 1973 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät München, das ich 1979 erfolgreich beendete. Im gleichen Jahr erhielt ich die Stelle einer wissenschaftlichen Hilfskraft am Institut für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels, der Zier- und Zoovögel der Ludwigs- Maximilians- Universität München.

Vom März 1979 bis zum Mai 1981 arbeitete ich an der vorliegenden Promotion.